

Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento
Departamento de Farmacología y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Caracterización del receptor nicotínico neuronal $\alpha 3\beta 4$ expresado en ovocitos de *Xenopus*. Un estudio estequiométrico

Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor presentada por
Anabel Sánchez García

Director
Luis Gandía Juan

Madrid, octubre de 2015

Abreviaturas y acrónimos

| | |
|---------------------------------|--|
| α-Bgt: | Alfa-bungarotoxina |
| α-Ctx | Alfa-conotoxina |
| ACh | Acetilcolina |
| AChR | Receptor para la acetilcolina |
| AChBP | Proteína de unión a acetilcolina |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico copia |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| BCA | Bloqueador de canal abierto |
| CCB | Célula cromafín bovina |
| CCDV | Canales de calcio dependientes de voltaje |
| CE₅₀ | Concentración eficaz 50 |
| COS | Línea celular de fibroblastos procedente de simio |
| CGRP | Péptido relacionado con el gen de la calcitonina |
| DMEM | Medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DMPP | Dimetilfenilpiperazinio |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EEM | Error estándar de la media |
| EGTA | Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético |
| FVDE | Fijación de Voltaje de Doble Electrodo |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| Gly-R | Receptor de glicina |
| GTP | Trifosfato de guanosina |
| HEPES | Ácido (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-etanosulfónico]) |
| I | Corriente iónica |
| KH | Tampón Krebs-HEPES |
| mAChR | Receptor muscarínico para la acetilcolina. |
| MAP | Modulador alostérico positivo |
| Mec | Mecamilamina |
| LB | Medio de cultivo Luria-Bertani |
| MLA | Metilicaconitina |
| nAChR | Receptor nicotínico para la acetilcolina |
| n-Bgt | n-Bungarotoxina (Bungarotoxina neuronal) |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| oxo-M | Oxotremorina M |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PNU-120596 | 1-(5-cloro-2,4-dimetoxi-fenil)-3-(5-metil-isoxazol-3-il)-urea |
| PNU-282987 | Hidrocloreuro de [N-[(3R)-1-azabicyclo [2.2.2] oct-3-il]-4-clorobenzamida] |

| | |
|------------------------|--|
| RAL | Receptores activados por ligando |
| RCU | Registro de Canal Único (<i>Single Channel Recording</i>). |
| SCM | Sitio de clonación múltiple |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SNP | Sistema nervioso periférico |
| V_m | Potencial de membrana |
| Zn²⁺ | Ión zinc |

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| MARCO EN EL QUE SE HA DESARROLLADO ESTA TESIS | 1 |
| 1.-INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1.-Apunte histórico | 3 |
| 1.2.-Receptores activados por ligando | 4 |
| 1.3.-La superfamilia de los receptores con lazo Cys | 7 |
| 1.4.-El receptor nicotínico de acetilcolina: estructura molecular | 8 |
| 1.5.-Mecanismo de activación de los receptores nicotínicos | 13 |
| 1.5.1.-Segundo dominio transmembrana, M2 | 18 |
| 1.5.2.-Efecto de la mutación de residuos en el dominio M2 | 22 |
| 1.6.-Receptores nicotínicos neuronales | 23 |
| 1.6.1.-Evolución de las subunidades nicotínicas | 26 |
| 1.7.- Subtipos, distribución y posibilidades estequiométricas de los nAChRs neuronales nativos | 27 |
| 1.8.- Farmacología de los nAChRs neuronales | 33 |
| 1.8.1.-Agonistas de los nAChRs | 34 |
| 1.8.2.-Antagonistas competitivos de los nAChRs | 36 |
| 1.8.3.-Moduladores alostéricos de los nAChRs | 37 |
| 1.9.-Fisiología | 43 |
| 1.10.-Los receptores nicotínicos de la célula cromafín bovina | 45 |
| 2.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 49 |
| 3.-MATERIALES Y MÉTODOS | 51 |
| 3.1.-Biología Molecular..... | 51 |
| 3.1.1.-Construcción de concatémeros: estrategia | 51 |
| 3.1.2.-Transcripción in vitro de ARNm | 62 |
| 3.2.-Sistema de expresión | 63 |
| 3.2.1.-Extracción y preparación de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> | 64 |
| 3.2.1.-Inyección de ARNm | 65 |
| 3.3.-Registros electrofisiológicos en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> | 68 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.1.-Fijación de voltaje de doble electrodo | 68 |
| 3.3.2.-Registros de canal único | 68 |
| 3.4.-Registros electrofisiológicos en células cromafines bovinas | 69 |
| 3.4.1.-Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas | 69 |
| 3.4.2.-Registro de corrientes nicotínicas en células cromafines bovinas mediante la técnica de patch-clamp | 70 |
| 3.5.-Modelado Molecular | 72 |
| 3.6.-Soluciones y compuestos químicos utilizados | 72 |
| 3.7.-Análisis estadístico | 72 |
| 4.-RESULTADOS | 75 |
| 4.1.-Efecto de la oxotremorina-M sobre distintos subtipos de receptores nicotínicos | 75 |
| 4.1.1.-Oxo-M se comporta como un agonista parcial del nAChR $\alpha 3\beta 4$ | 77 |
| 4.1.2.-Agonismo parcial de la oxo-M en nAChR $\alpha 7$ | 82 |
| 4.1.3.-Efecto de oxo-M sobre nAChR $\alpha 4\beta 2$ | 87 |
| 4.1.4.-Modelado molecular | 93 |
| 4.2.- Estudio de dos estequiometría alternativas para el nAChR $\alpha 3\beta 4$ | 96 |
| 4.2.1.-La inyección de proporciones diferentes de ARN $\alpha 3:\beta 4$ en ovocitos produce receptores con distinta sensibilidad a ACh | 97 |
| 4.2.2.-Ovocitos $\alpha 3\beta 4$ bovinos 1:9 y 9:1 exhiben una similar sensibilidad a oxo-M | 101 |
| 4.2.3.-Modulación diferencial por zinc en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 1:9 y 9:1 | 105 |
| 4.2.4.-Los receptores expresados en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 1:9 y 9:1 difieren en sus propiedades a nivel de canal único | 109 |
| 4.3.-Expresión de las estequiometrías del nAChR $\alpha 3\beta 4$ humano mediante concatenación de las subunidades | 112 |
| 4.3.1.-La coinyección de las construcciones $\beta 4-\beta 4-\alpha 3+\beta 4-\alpha 3$ ó $\beta 4-\alpha 3-\alpha 3+\beta 4-\alpha 3$ produce receptores con similares características funcionales a los receptores ($\alpha 3$) ₂ ($\beta 4$) ₃ y ($\alpha 3$) ₃ ($\beta 4$) ₂ formados a partir de subunidades no ligadas | 115 |
| 4.3.2.-Los receptores concatémicos funcionales expresados son resultado de la completa incorporación a la membrana de las proteínas de fusión | 117 |

| | |
|--|------------|
| 4.4.-Caraterización farmacológica de los nAChRs nativos de la célula cromafín bovina .. | 124 |
| 4.4.1.-Respuesta de los nAChRs nativos de las células cromafines bovinas a oxo-M | 125 |
| 4.4.2.-Modulación de los nAChRs nativos de la célula cromafín bovina por zinc | 128 |
| 5.-DISCUSIÓN | 131 |
| 5.1.-Efecto de la oxO-M sobre los nAChRs $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ | 132 |
| 5.2.-Estequiometrías alternativas del nAChR $\alpha 3\beta 4$ | 136 |
| 5.3.-Efecto de la oxo-M y modulación por zinc de los nAChRs nativos de la célula cromafín bovina | 142 |
| 5.4.-Efecto de la concatenación de las subunidades α y β en las propiedades funcionales del receptor $\alpha 3\beta 4$ | 145 |
| 5.5.-Efecto de la incorporación subunidades $\beta 4$ L9'T en los concatémeros del receptor $\alpha 3\beta 4$ | 150 |
| 6.-CONCLUSIONES | 153 |
| 7.-REFERENCIAS | 155 |

MARCO EN EL QUE SE HA DESARROLLADO ESTA TESIS

El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido desarrollado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid. A lo largo de más de tres décadas, el ITH ha cultivado una amplia y sólida línea de investigación relacionada con la caracterización de los principales mecanismos celulares implicados en los procesos de comunicación neuronal.

En 1921, Otto Loewi postuló la existencia de una neurotransmisión de tipo químico, demostrando que una sustancia que él denominó *vagustoff* (actualmente conocida como acetilcolina) se liberaba tras la estimulación del nervio vago y servía para estimular a otras neuronas. Más tarde, en 1936, Sir Henry Dale demostró que la acetilcolina (ACh) era liberada por estimulación de los nervios motores en la placa motora. Finalmente, en los años 50 Fatt y Katz postularon que la transmisión química estaba mediada por la estimulación de un receptor por su correspondiente agonista fisiológico (en el caso de la unión neuromuscular la ACh, actuando sobre receptores de tipo nicotínico), lo que producía la apertura de un canal por el que pasaban iones, generando así una acción excitadora en el músculo.

Tras estas aportaciones, el estudio y caracterización de ese receptor para la acetilcolina se convirtió en una prioridad y se trató de indagar en la naturaleza y función de estos receptores presentes en el sistema nervioso. En los años 80 el abordaje de este tipo de estudios se realizó mediante técnicas de biología molecular, clonando los genes que codificaban la expresión de las diferentes subunidades que componen este receptor, y expresándolos en sistemas heterólogos, fundamentalmente en ovocitos de *Xenopus laevis*. Desde entonces se han conseguido identificar una amplia variedad de subtipos de receptores nicotínicos. Estos receptores se engloban bajo la denominación de receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChRs) y constituyen un pequeño grupo dentro de los receptores activados por ligando (RAL).

El conocimiento de su estructura y función ha hecho posible el estudio de sus implicaciones fisiológicas y patológicas, lo que conlleva al abordaje de su posible farmacología y con ello al diseño y síntesis de nuevos fármacos que potencialmente puedan servir para atenuar las deficiencias de estos receptores que se aprecian en diversas enfermedades neurodegenerativas, entre otras diversos tipos de demencia.

El trabajo realizado en esta tesis se enmarca en una línea de investigación básica-aplicada que se relaciona con la caracterización, desde un punto de vista biofísico y funcional, de los receptores nicotínicos para la acetilcolina (nAChRs) de tipo neuronal presentes en la membrana de la célula cromafín adrenomedular y que controlan

fisiológicamente el proceso de liberación de catecolaminas. Si bien, se ha descrito la existencia de ARNm que codifica para las subunidades $\alpha 7$, (Garcia-Guzman y *col.*, 1995), $\alpha 3$ y $\beta 4$ (Criado y *col.*, 1992; Campos-Caro y *col.*, 1997) y $\alpha 5$ (Campos-Caro y *col.*, 1997), no se ha demostrado aún si todas estas subunidades se asocian para dar lugar a un receptor complejo $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)\alpha 7$ o si existen en diferentes combinaciones de subunidades formando distintas subpoblaciones de receptores en la membrana de la célula cromafín bovina, a saber, receptores de subtipo $\alpha 7$ y receptores de subtipo $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)$.

En base a estos antecedentes, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido caracterizar las propiedades de los nAChRs del subtipo $\alpha 3\beta 4$, cuya presencia se ha constatado en la célula cromafín de distintas especies animales tales como rata, ratón, humano y bovino, siendo este último subtipo celular ampliamente estudiado en nuestro grupo. A partir de esta caracterización podríamos utilizar a la célula cromafín adrenomedular como un excelente modelo para el estudio de nuevas moléculas agonistas de los receptores, compuestos que puedan resultar útiles terapéuticamente en analgesia, neuroprotección y en procesos de deterioros cognitivos que tienen lugar en enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer, la esquizofrenia o el autismo.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.-APUNTE HISTÓRICO.

A finales del siglo XIX notables científicos realizaron una serie de contribuciones fundamentales mediante los hoy conocidos experimentos “clásicos” en el campo de la transmisión sináptica química y canales iónicos activados por ligando. El concepto de receptor se formuló por primera vez en el siglo XIX por Paul Ehrlich (quién hipotetizó la interacción química entre agentes antibacterianos y sus dianas) y por John N. Langley, mientras estudiaba la acción de la atropina y pilocarpina. “Podemos afirmar que en las terminaciones nerviosas y en las células glandulares existe/n alguna/s sustancia/s con la/s que la atropina y la pilocarpina son capaces de formar compuestos” (Langley, 1878). Esta sustancia, como la conocemos ahora, es el receptor muscarínico para la acetilcolina (mAChR). Algunos años más tarde, en 1889, Langley demostró que la nicotina podía producir una contracción tónica en el músculo de las ranas, que podía bloquearse mediante curare, estableciendo la primera evidencia de un receptor nicotínico para la acetilcolina (nAChR). La primera evidencia experimental para la existencia de ACh como neurotransmisor vino más tarde, en 1921 por Otto Loewi, cuando estudió la innervación autonómica de dos corazones aislados y comprobó que cuando el nervio vago de uno de los corazones era estimulado, el segundo corazón se estimulaba también, a pesar de no existir un contacto directo entre ambos. Una sustancia liberada de la terminal nerviosa denominada *vagustoff* (Cooke y Lipkin, 1972) era la responsable de mediar este efecto, sustancia que años más tarde se reconoció ser la ACh. Henry Dale, en 1914, pudo distinguir dos tipos de actividades diferentes de la ACh, que denominó muscarínica y nicotínica (Dale y col., 1936), aunque en aquella época aún se desconocía la existencia de dos tipos diferentes de receptores para estas dos sustancias. En 1909, A. V. Hill realizó el primer análisis cuantitativo de los resultados obtenidos del tratamiento del AChR muscular con nicotina y curare, siendo desarrolladas sus ideas por sus sucesores. Su trabajo y el de Bernard Katz, A. J. Hill, John Gaddum y Heinz Schild en los 30 años siguientes, sentaron las bases en la investigación de los canales iónicos (Colquhoun y col., 1998). Un mayor avance en la comprensión de la transmisión sináptica en los músculos esqueléticos tuvo lugar en los años 50, cuando el mecanismo del potencial de acción fue postulado por Hodgkin y Huxley en 1952 y la liberación cuántica de ACh en la placa motora del músculo fue descubierta por Katz y Fatt en 1951 (Purves y col., 2001; Colquhoun y col., 1998)). La interpretación de la cinética de los canales iónicos se realizó unos años más tarde (1957) por del Castillo y Katz, con su mecanismo de

acción agonista, lo que hizo que los trabajos sobre canal único predominaran durante los años 70 y continúen haciéndolo hoy.

Ha pasado más de un siglo desde que Langley y Ehrlich presentaran por primera vez el concepto de receptor y desde entonces se ha avanzado mucho. Se han identificado una amplia variedad de receptores nicotínicos para la acetilcolina; actualmente, somos capaces de medir las corrientes macroscópicas y microscópicas que fluyen a través de estos canales y los tiempos de apertura y cierre de canales individuales; sabemos cuántas moléculas agonistas se unen a la mayoría de los receptores y en algunos casos, también sabemos su estructura y secuencia.

El conocimiento de la estructura y función de los nAChRs han hecho posible el estudio de sus implicaciones fisiológicas y patológicas, lo que conlleva el abordaje de un nuevo campo en el conocimiento de estos receptores como es su farmacología; a saber, la búsqueda de medicamentos que atenúen las deficiencias de estos receptores implicados en enfermedades tan devastadoras como las demencias.

La presente tesis trata sobre las propiedades farmacológicas y estructurales de los receptores nicotínicos para la ACh $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y, principalmente, $\alpha 3\beta 4$, implicados en la modulación de la liberación de un amplio rango de neurotransmisores en el SNC y SNP, constituyendo una diana terapéutica para una gran número de enfermedades relacionadas con el empeoramiento cognitivo y enfermedades neurodegenerativas, esquizofrenia, alteraciones del humor, dolor crónico, déficit de atención y adicción a la nicotina.

1.2.-RECEPTORES ACTIVADOS POR LIGANDO

Durante la activación neuronal se liberan a la hendidura sináptica pequeñas moléculas, los neurotransmisores, presentes en la neurona presináptica; de esta manera se transmite la información desde una neurona a otra adyacente o a un órgano diana. Los neurotransmisores son capaces de realizar su función a través de la activación de receptores presentes en la membrana de la célula postsináptica que se denominan “receptores activados por ligando (RAL)”. Así, cuando el neurotransmisor se une a estos receptores induce un cambio de conformación en su estructura que permite la apertura de un poro iónico por el que fluyen iones a su través. Esta entrada o salida de iones provoca a su vez cambios en el potencial de membrana de la neurona provocando la despolarización o la hiperpolarización de la misma, dependiendo del agonista utilizado y del tipo de RAL expresado en esa célula.

Debido a la gran variedad de RAL existentes en los diferentes tejidos, se ha realizado una clasificación de los mismos atendiendo a diferentes criterios como son la topología

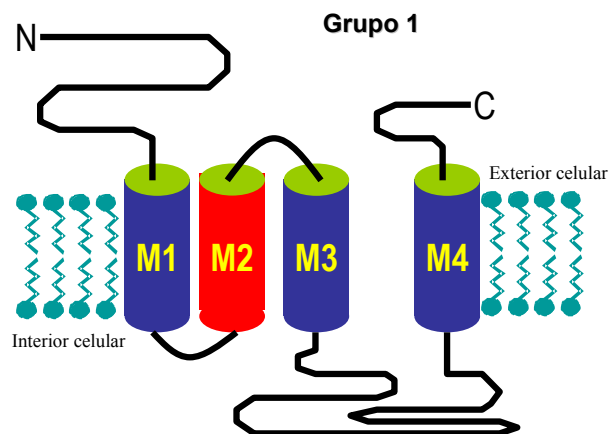
de las subunidades con respecto a la membrana, la homología de sus secuencias, la composición de subunidades, la permeabilidad del poro iónico y/o la selectividad a los agonistas. Según todos estos criterios, se puede realizar una clasificación artificial de los RAL en tres grupos o superfamilias (Bond y col., 1996; North, 1996) tal y como se describe en la siguiente tabla (Tabla 1).

TABLA 1. Resumen de las características de los diferentes tipos de RAL.

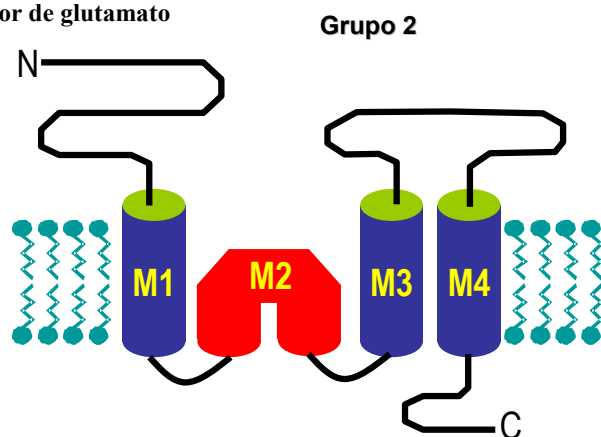
| Grupos | Tipo de receptor | Selectividad iónica | Subunidades | Extremos N y C-terminal |
|----------------|--|---------------------|---|------------------------------------|
| Grupo 1 | <i>R. nicotínico</i> | Cationes | | |
| | <i>R. de glicina</i> | Aniones | 5 subunidades/ | |
| | <i>R. de serotonina (tipo 3)</i> | Cationes | 4 segmentos | C y N: Exterior celular |
| | <i>R. de GABA_A (ácido γ-aminobutírico tipo A)</i> | Aniones | transmembrana | |
| | <i>Canal iónico activado por Zn²⁺</i> | Cationes | | |
| Grupo 2 | R. de glutamato | | | |
| | R. de kainato | | | |
| | R. de NMDA (N-metil-D-aspartato) | Cationes | 4 (Rosenmund y col., 1998) o 5 (Premkumar y col., 1997) subunidades | N: Extracelular C: Intracelular |
| | R. de AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5 metil-4-isoxazol) | | | |
| Grupo 3 | R. Purinérgicos (P _{2x}) | Cationes | Máximo 3 subunidades (Stoop y col., 1999)/2 segmentos transmembrana Bucle extracelular | C y N: Interior celular |

En la figura 1 se pueden observar esquemáticamente la topología de estos receptores.

A Receptor de acetilcolina/serotonina



B Receptor de glutamato



C Receptor purinérgico

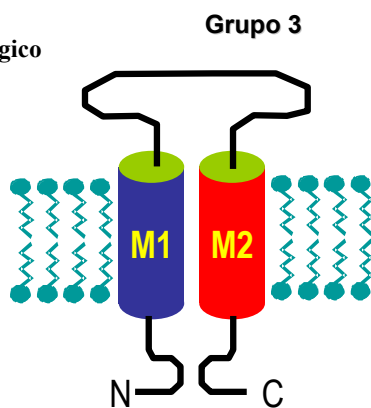


Figura 1. Estructura de los receptores activados por ligando. (A) Estructura de los nAChRs. (B) Estructura de los receptores de glutamato. (C) Estructura del receptor de purina. M1-M4= Representan segmentos transmembrana. N= Extremo N-terminal. C= Extremo C-terminal.

1.3.-LA SUPERFAMILIA DE LOS RECEPTORES CON LAZO Cys

El nAChR es el prototipo de la superfamilia de los receptores con lazo Cys de los receptores activados por ligando, a la que también pertenecen los receptores del ácido γ -aminobutírico de tipo A y C (GABA_A y GABA_C), los receptores de glicina, los receptores de serotonina de tipo 3 (5-HT₃) y el canal iónico activado por Zn²⁺ en vertebrados (ZAC), y en invertebrados canales de cloruro activados por glutamato, serotonina e histamina y canales aniónicos activados por GABA (Karlin, 2002; Lester y col., 2004; Jones y col., 2006).

Todos los miembros de esta familia comparten un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos y se cree que comparten un ancestro evolutivo común (Ortells y col., 1995). Sus subunidades son similares también (Fig. 2); comparten algunos motivos característicos en su estructura secundaria: un lazo Cys (dos cisteínas unidas mediante puentes disulfuro separadas por 13 aminoácidos) en el extremo N-terminal, dominio donde se cree que está el sitio de unión al agonista; cuatro segmentos transmembrana con estructura hélice- α (M1-4), una gran región citoplásmica entre los segmentos M3 y M4 (Stroud y col., 1990; Karlin y col., 1995; Unwin, 2003) y un extremo C-terminal extracelular relativamente corto y de secuencia variable. Cada miembro de la superfamilia es un pentámero y el segmento M2 de cada subunidad es el principal contribuyente a la formación del poro del canal.

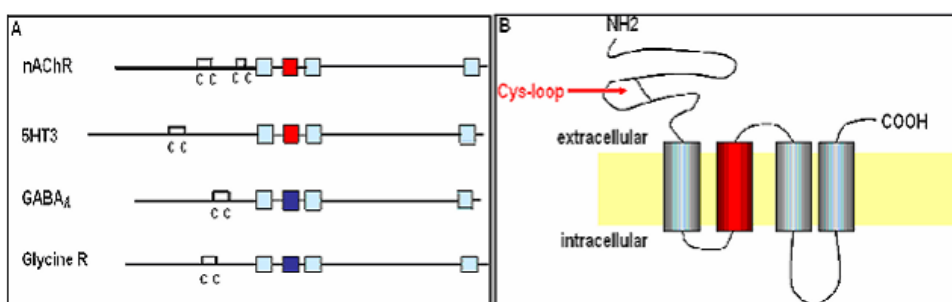


Figura 2. Superfamilia de de los receptores con lazo Cys. (A) Las subunidades que forman a los distintos receptores de la superfamilia muestran una similitud considerable en su tamaño y secuencia. Las cisteínas que forman el lazo en el extremo N-terminal, están conservadas a lo largo de la superfamilia. (B) Representación esquemática de las subunidades de los receptores con lazo Cys. Los extremos N-terminal y C-terminal son extracelulares y en el N-terminal está presente el lazo-Cys; cuatro dominios transmembrana conforman una subunidad (M1-M4 en color azul y rojo) y el segmento M2 (rojo) forma parte del poro iónico; el gran dominio intracelular localizado entre los segmentos M3 y M4 se observa en la figura.

1.4.-EL RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA: ESTRUCTURA MOLECULAR

Los nAChRs son proteínas pentaméricas transmembrana que se identificaron por primera vez en la unión neuro-muscular y en el órgano eléctrico del pez *Torpedo californica*. A través de ellos se genera una corriente catiónica rápida cuando el neurotransmisor ACh se une a ellos.

Existen dos tipos de nAChRs, muscular y neuronal, y ambos están formados por el ensamblaje de subunidades diferentes, aunque homólogas. Las subunidades del nAChR se dividen en dos clases principalmente: las subunidades α ($\alpha 1-10$), que poseen dos cisteínas adyacentes esenciales para la unión de la molécula de ACh al receptor, y subunidades no- α ($\beta 1-4$, γ , δ , ϵ), que carecen de dichas cisteínas.

El conocimiento actual de la estructura del nAChR procede principalmente del estudio del receptor nicotínico presente en el órgano eléctrico del pez raya *Torpedo marmorata* y de la estructura cristalizada de la proteína de unión a ACh (AChBP) del caracol *Lymnea stagnalis* (Karlin, 2002). Los resultados procedentes del estudio de estas dos estructuras han sido excepcionalmente importantes para el entendimiento de la estructura del receptor y como podría relacionarse ésta con su función, corroborando la información obtenida mediante otras aproximaciones experimentales, como es el uso de ligandos específicos y toxinas de serpientes, además de aportar nueva información al respecto.

a. El AChR del órgano eléctrico del pez *Torpedo*

El único canal iónico activado por ligando cuya estructura se conoce en profundidad es el AChR de la membrana postsináptica del órgano eléctrico de la raya *Torpedo*. Los trabajos de microscopía electrónica de Unwin y colaboradores (Unwin, 1993; Unwin, 1996; Miyazawa y col., 1999; Tierney y col., 2000), con una resolución de hasta 4 Å (Unwin, 2005) tienen la ventaja de visualizar la proteína en su ambiente natural, con la membrana lipídica y los iones a su alrededor (Unwin, 2003). El AChR del pez *Torpedo* es una glicoproteína pentamérica de 290 kDa, formada por cuatro subunidades transmembrana diferentes (α , γ , β y δ) en la combinación estequiométrica $\alpha 2\beta\gamma\delta$ (Fig. 3.A y B). En el receptor se diferencian 3 regiones distintas: un dominio extracelular de unión al agonista formado por el gran extremo N-terminal y el extremo C-terminal más corto de las subunidades, un dominio transmembrana formado por el poro selectivo a cationes y un pequeño dominio intracelular, resultando una estructura con un tamaño total de 160 Å. Los sitios de unión al ligando se localizan en el dominio extracelular, en lados opuestos entorno al poro y consisten en dos bolsillos de unión a ACh en las subunidades α o cerca de las interfases α - γ y α - δ . El dominio extracelular contiene

además un largo vestíbulo central con un diámetro de aproximadamente 20 Å y que se extiende hacia el dominio transmembrana haciéndose más estrecho. El poro del canal, que forma el estrecho paso hídrico, contiene la compuerta que solo se abre cuando la ACh ocupa ambos sitios de unión (Fig. 3.C). El segmento M2 de cada subunidad, contiene aproximadamente 19 aminoácidos (con una longitud de 40 Å aproximadamente) y contribuye a la formación del poro. Estudios de mutagénesis indican que el anillo de residuos en posición 263 forman la parte más estrecha del poro y determina la selectividad iónica del canal (Imoto y col., 1991; Cohen y col., 1992). La parte más interna del poro está rodeada por una cubierta exterior de hélices- α de M1, M3 y M4 que aíslan al poro de la membrana lipídica (Unwin, 2005).

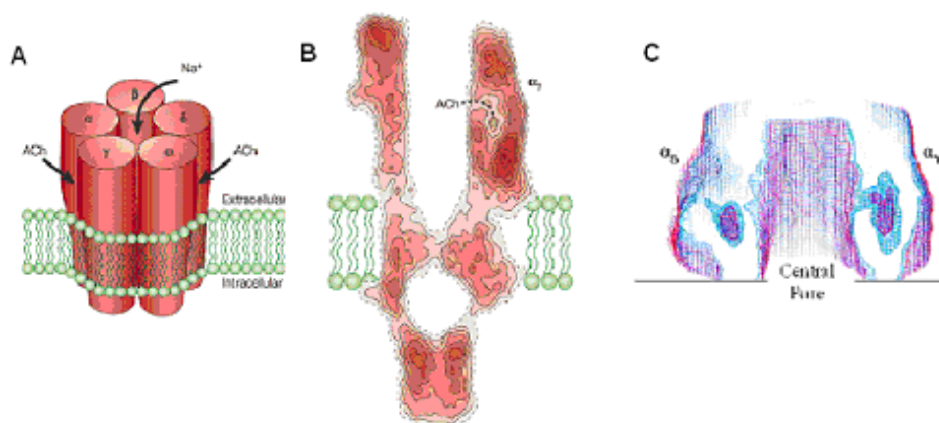


Figura 3. Estructura del receptor nicotínico de ACh. (A) Representación esquemática del receptor nicotínico muscular pentamérico, mostrando los cuatro tipos diferentes de subunidades (α , γ , β y δ) ensambladas alrededor de un canal selectivo a cationes, y dos sitios de unión a ACh presentes en la región extracelular, en las interfases α - γ y α - δ (Karlin, 2002). (B) Imagen transversal del AChR de *Torpedo*, a una resolución de 4,6 Å (Miyazawa y col., 1999). (C) Imagen transversal de la parte extracelular del poro del canal en vista tridimensional, mostrando los dos sitios de unión a ACh (Miyazawa y col., 1999).

b. La AChBP

Un conocimiento más profundo acerca de las interacciones ligando-receptor de los receptores con lazo Cys se ha obtenido tras la identificación y cristalización de la proteína de unión a la ACh (AChBP), recientemente descubierta en el caracol acuático *Lymnea stagnalis* (Brejc y col., 2001; Smit y col., 2001), en el caracol marino *Aplysia californica* (Hansen y col., 2005; Ulens y col., 2006) y en el caracol de agua dulce *Bulinus truncatus* (Celie y col., 2005). Esta proteína pentamérica que está formada por unos 210 residuos, se produce y almacena en las células gliales y se libera en la hendidura sináptica donde modula la transmisión sináptica mediante su unión a la

ACh. Está muy relacionada estructuralmente con el dominio N-terminal de las subunidades α del receptor nicotínico, con las que comparte un 20-24% de similitud, compartiendo también un 15-18% de homología con la secuencia de las subunidades de los receptores 5-HT₃, GABA_A, GABA_C y los receptores de glicina. Carece de dominios transmembrana e intracelular pero puede unir agonistas y antagonistas competitivos del receptor nicotínico, como son la nicotina, curare, epibatidina, α -bungarotoxina, y naturalmente la ACh (ver revisión de (Karlin, 2002) para mayor información).

La AChBP también posee el lazo Cys, formado solo por 12 en vez de 13 residuos entre las dos cisteínas. Brejc y colaboradores obtuvieron la estructura cristalizada de la proteína con una resolución de 2,7 Å: es un cilindro con un diámetro de 80 Å y una altura de 62 Å; 5 subunidades idénticas (62 x 47 x 34 Å) que forman un canal de aproximadamente 18 Å de diámetro (Fig. 4). Cada subunidad comienza en su extremo N-terminal con una α -hélice a la que le siguen dos 3_{10} hélices cortas y diez hojas β , organizadas con una topología similar a la de las inmunoglobulinas. La estructura secundaria y las dimensiones del cilindro de la AChBP concuerdan con las obtenidas para el dominio extracelular del nAChR del pez *Torpedo*.

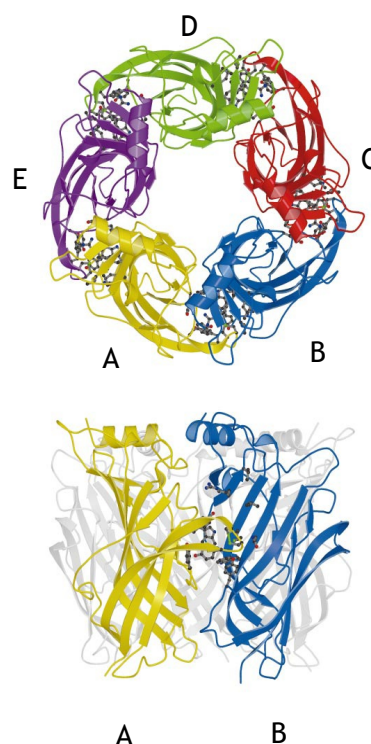


Figura 4. Estructura cristalizada de la AChBP. (A) Vista desde arriba de las cinco subunidades idénticas, etiquetadas como A, B, C, D y E (y coloreadas de forma distinta), ensambladas entre sí para formar la proteína. La unión de ACh se produce en las interfaces entre subunidades adyacentes (A-B, B-C, C-D, D-E, E-A). (B) Vista perpendicular de la AChBP. El sitio de unión situado ecuatorialmente, se resalta solo en la interfase A (amarillo)-B (azul).

c. El sitio de unión a ACh

El gran número de estudios realizados sobre el nAChR muscular del órgano eléctrico del pez *Torpedo* ha hecho posible identificar los residuos implicados en la unión al agonista mediante aproximaciones bioquímicas y funcionales. Los estudios de unión de radioligandos demostraron que, en condiciones de equilibrio, los nAChRs poseen dos sitios de unión con alta afinidad a agonistas y a antagonistas competitivos (Blount y col., 1989). Ambos sitios deben estar ocupados para la completa activación del receptor. Estudios mutacionales y de marcaje por afinidad posteriores demostraron que los sitios de unión se localizan en la interfases en las subunidades α - γ y α - δ del nAChR muscular (Fig. 5) (Corringer y col., 2000; Arias y col., 2001). Las evidencias experimentales más concluyentes provienen de: a) experimentos de marcaje por afinidad que muestran que las sondas farmacológicas marcan principalmente las subunidades α_1 , y en una menor proporción las subunidades γ y δ ; (b) estudios de expresión de subunidades del nAChR muscular en líneas celulares, que demuestran que la subunidad α_1 , junto con la subunidad γ o δ , formaron bolsillos de unión a ACh con farmacología nativa, mientras que la coexpresión con otras subunidades o la expresión de una sola subunidad no produjeron sitios de unión a ACh.

Los estudios mencionados anteriormente también identificaron aminoácidos clave localizados en lazos no contiguos (denominados de la A a la C) de las subunidades α , junto con aminoácidos adyacentes de las subunidades γ o δ (localizados en los denominados lazos D-F), que contribuyen a la formación de los dominios de unión al ligando. Los lazos A-C recibieron el término de componente primario, principal o lado + del sitio de unión al agonista, mientras que los lazos D-F se apodaron componente secundario, complementario o lado – del sitio de unión (Fig. 5) (Kao y col., 1986; Dennis y col., 1988; Galzi y col., 1990; Middleton y col., 1991; Czajkowski y col., 1993; Corringer y col., 1995; Sine y col., 1995). Los aminoácidos identificados en las subunidades α_1 de *Torpedo* son Tyr93, Trp149, Tyr190 y Tyr198, y se conservan en el resto de subunidades α del nAChR (con excepción de la subunidad neuronal α_5 donde la Tyr 190 es reemplazada por un Asp190), y a lo largo de la familia de receptores con lazo Cys. Los estudios realizados revelaron también la presencia de un par de cisteínas adyacentes, Cys 192 y Cys 193 que forman un puente disulfuro atípico. Se ha demostrado que estos dos residuos se encuentran en las dos subunidades α_1 del nAChR (Karlin y col., 1995; Karlin, 2002), confirmándose más tarde su presencia en todas las subunidades α del nAChR.

Como ya se ha comentado, en las subunidades no- α se localizan residuos que también contribuyen a la formación de los sitios de unión a ligandos: γ Trp53, δ Trp55, γ Tyr111, δ Arg113, γ Leu109 y δ Leu111.

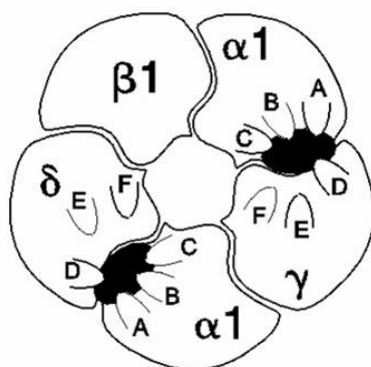


Fig. 5 Dibujo esquemático del nAChR muscular, vista desde arriba (adaptado de (Corringer y col., 2000). Los sitios de unión a ACh se localizan en las interfases de las subunidades $\alpha 1$ - γ y $\alpha 1$ - δ y están formados por los lazos A, B y C del “componente principal” y los lazos D, E y F del “componente complementario”.

El conocimiento sobre el dominio de unión al ligando de los receptores con lazo Cys, y en especial de los nAChRs, se ha beneficiado de la disponibilidad de imágenes de alta resolución de estas proteínas, obtenidas a partir de la estructura cristalizada de la AChBP (Brejc y col., 2001; Celie y col., 2004; Hansen y col., 2005). En los 5 sitios de unión a ACh que contiene la proteína, se han identificado aminoácidos aromáticos que contribuyen al bolsillo de unión: Tyr89 en el lazo A; Trp143 y Trp145 en el lazo B; Tyr185, Tyr192, Cys187 y Cys188 en el lazo C, Trp53, Gln55 en el lazo D; Arg104, Val106, Leu112 y Met114 en el lazo E; y Tyr 164 en el lazo F. En particular, la obtención de la estructura cristalizada de la AChBP de alta resolución confirma muchas de las observaciones previas realizadas sobre la estructura de las proteínas con lazo Cys (Unwin, 1989) y muestran más datos sobre el papel de los residuos conservados en las subunidades que participan en la unión con el ligando.

Otro gran avance en la estructura del sitio de unión a ACh lo aportan los estudios de microscopía electrónica de dos dimensiones del nAChR de *Torpedo*, a una resolución de 4 Å que revelan el esqueleto proteico, la localización de carbonos- α , cadenas laterales pesadas y las posibles interacciones entre subunidades (Miyazawa y col., 2003). Además, el modelado por homología de la AChBP y el nAChR de *Torpedo* arrojan luz sobre el acoplamiento existente entre la unión del agonista y la apertura del canal, aportando una mayor comprensión del mecanismo de activación del nAChR.

Así, en el dominio de unión los agonistas están completamente embebidos en la proteína (Fig. 6) (Unwin, 2005). En el centro de cada bolsillo de unión está el Trp 143 del lazo B del componente principal, que establece interacciones catión- π con el agonista. Los otros cuatro residuos aromáticos forman el resto del bolsillo de unión, dirigiendo sus electrones π o grupos hidroxilo hacia el agonista. Otros residuos establecen puentes de hidrógeno con la cadena principal del agonista o establecen enlaces de Van der Waals para estabilizarlo. Es importante señalar que el lazo C del lado + tapa la entrada de la cavidad, atrapando al agonista en el bolsillo de unión.

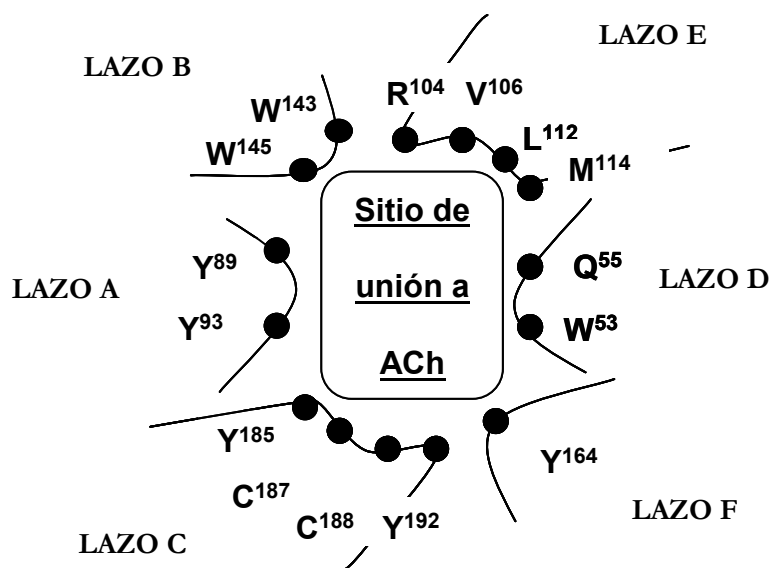


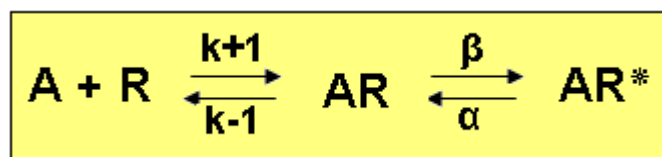
Fig. 6. Sitio de unión a ACh de AChBP (modificado de (Brejc y col., 2001)). Dibujo que muestra la organización de los lazos alrededor de la molécula de ACh y los residuos implicados en la unión a la misma. Cada sitio de unión al ligando se encuentra en la hendidura existente en la interfase entre subunidades, formados por los lazos de lado + de una subunidad y el lado – de la subunidad siguiente, en sentido contrario de las agujas del reloj. Cuatro residuos aromáticos forman parte de la base de la cavidad que hospeda a la ACh (Y⁸⁹, Y¹⁸⁵, Y¹⁶⁴ y W⁵³). Las paredes las forman los aminoácidos Tyr¹⁹², Trp¹⁴³, la cadena principal del Trp¹⁴⁵, las cadenas laterales de Met¹¹⁴ y Gln⁵⁵ y las Cys¹⁸⁷ y Cys¹⁸⁸. La parte hidrofóbica de Arg¹⁰⁴, Val¹⁰⁶ y Leu¹¹² forman la parte superior del sitio de unión.

1.5.-MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS

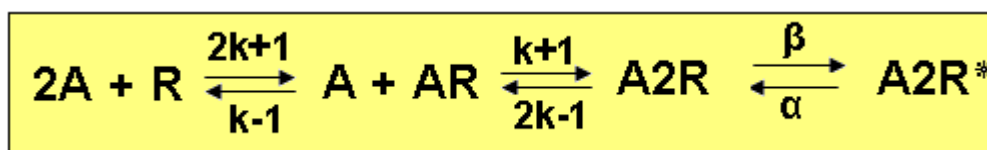
La unión de dos moléculas de ACh al receptor provoca la rápida apertura del canal y finalmente la desensibilización del receptor. Sin embargo, el acontecimiento descrito no es tan simple como parece: tres clases de efectores trabajan en el nAChR (agonistas, antagonistas competitivos y no competitivos) y los sitios de unión de estas moléculas interaccionan en la distancia durante su unión y liberación del receptor.

Estudios bioquímicos y electrofisiológicos evidencian que los dos sitios de unión del receptor del pez *Torpedo* son diferentes y entre ellos se establecen interacciones cooperativas (Galzi y col., 1991; Edmonds y col., 1995). Por otro lado, los experimentos de microscopía electrónica realizados por Unwin y colaboradores demostraron que la unión de la ACh al receptor de *Torpedo* inicia dos eventos por separado: primero, una alteración a pequeña escala en la región del sitio de unión seguida de un movimiento rotacional a gran escala de las subunidades α . Los cambios conformacionales también afectan a las hélices del dominio transmembrana M2 que cambia su configuración, produciendo un ensanchamiento del poro, provocando la apertura del canal (Unwin y col., 2002). Los dos sitios de unión muestran una diferente afinidad por la ACh (Jackson, 1988), lo que podría explicarse por la contribución de las subunidades no- α a los sitios de unión y, por lo tanto, las interacciones entre las interfases de las subunidades podrían influir en la afinidad del receptor (Czajkowski y col., 1995; Unwin, 2005).

Actualmente se acepta que la unión del agonista al receptor debería considerarse como un proceso separado a la apertura del canal iónico. El sencillo mecanismo para la apertura del canal presentado por Castillo y Katz en 1957 (Del Castillo y col., 1957), sugería que la activación del receptor se producía en dos etapas: el agonista (A) se une al receptor (R), formando un complejo (AR) y a continuación se produce un cambio conformacional que provoca la apertura del canal (AR*)

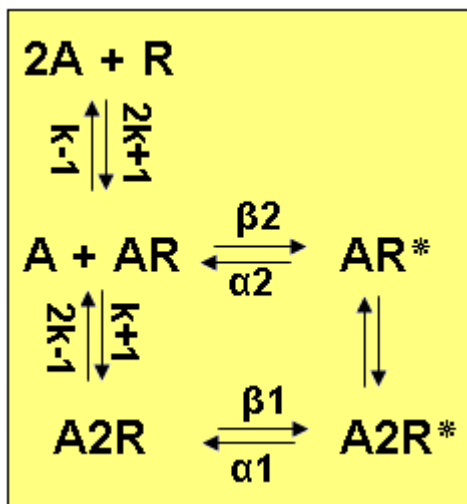


La presentación de este mecanismo fue un gran avance en aquella época. Sin embargo, en el caso del nAChR donde se deben unir dos agonistas para conseguir un estado con alta probabilidad de aperturas, se necesitó reajustar el modelo para introducir los dos pasos secuenciales de la unión del ligando (Colquhoun y col., 1985).

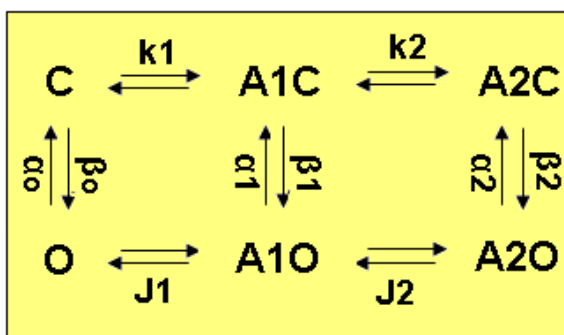


El esquema del mecanismo de unión se amplió con las evidencias obtenidas a partir de estudios electrofisiológicos que demostraron que el canal se podría abrir incluso

con la unión de una sola molécula de agonista al receptor (Colquhoun y *col.*, 1981), aunque con una probabilidad más baja.



El estudio de (Jackson, 1988) en fibras musculares en cultivo también reveló que el canal iónico de los nAChRs: podía abrirse espontáneamente en ausencia de agonista, proponiendo otro mecanismo de activación del receptor en el que C y O representan respectivamente los estados cerrados y abiertos del canal.



Los estados cerrados (C) cambian a estados abiertos (O) en un proceso reversible llamado “activación”. Dos moléculas de agonista (A) se unen al estado cerrado del receptor, y la constante de equilibrio de activación β incrementa conforme aumenta el número de moléculas de agonista unidas. La amplificación de la constante β por la unión del agonista se estima de 10 millones de veces con las dos moléculas. El origen de esta amplificación se debe a una mayor afinidad del agonista por el estado abierto que por el estado cerrado. Para la ACh, las constantes de disociación para los estados cerrados, K_1 y K_2 , están en el rango micromolar, mientras las constantes de disociación para los estados abiertos, J_1 y J_2 , se estiman estar en el rango nanomolar (Jackson, 1989; Ohno y *col.*, 1996). En consecuencia, las consideraciones

mecanicistas predicen que debería producirse un marcado cambio conformacional del sitio de unión entre los estados abiertos y cerrados del canal.

El mecanismo descrito anteriormente, presentan la unión del agonista y la activación como acontecimientos independientes y consecutivos, y lo que es más importante, supone que la transición entre el estado cerrado al abierto ocurre en un solo paso. Descubrimientos recientes sobre las propiedades de canal único del receptor de glicina heteromérico $\alpha_1\beta$ (que presenta una gran homología con el nAChR), sugieren que la activación puede dividirse en dos pasos: un estado “flip” y un estado abierto (Fig. 7). Tal y como se ha descrito para la transición alostérica de las enzimas (Wyman y Allen, 1951), la reacción de “flipping” es la transición del canal desde el estado cerrado a un estado preactivo, no conductivo (todavía cerrado) que precedería al estado abierto (Burzomato y col., 2004). Este cambio conformacional confiere una mayor afinidad por el ligando y se incrementa linealmente con el número de ligandos unidos. Desde un punto de vista estructural, tal incremento es posible solo si el cambio conformacional al estado pre-abierto incrementa la accesibilidad del agonista a su sitio de unión, dando lugar a la unión de más moléculas al sitio de unión y, por consiguiente, una mayor afinidad (Beato y col., 2004; Burzomato y col., 2004). Parece ser que los nAChRs también presentan este mecanismo “flip” o de transición (Lape y col., 2008) y está por ver si otros RAL exhiben el mismo comportamiento o uno similar.

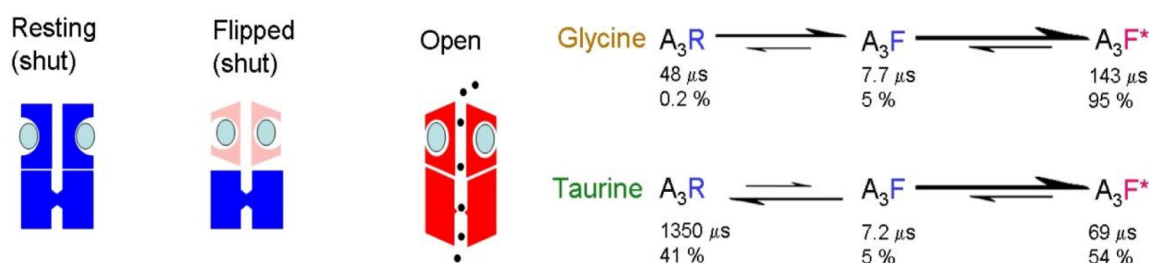


Fig. 7. Activación del receptor de glicina por un agonista total o parcial. En la figura se muestra el paso del estado de reposo al estado activo a través del estado preactivo, tras la unión del agonista al receptor. Las cinéticas de activación para el receptor de glicina difieren en gran medida en el primer paso, de reposo a preactivo. Ante la unión del agonista parcial taurina, el receptor tarda mucho más tiempo (ver valor absoluto de su vida media y porcentaje) en pasar al estado preactivo que con la unión de glicina (arriba). Una vez en el estado preactivo, independientemente del agonista, el receptor pasa rápidamente al estado activo. La probabilidad de apertura frente a la de vuelta al estado de reposo es muy alta (96%). Adaptado de Lape y col., 2008.

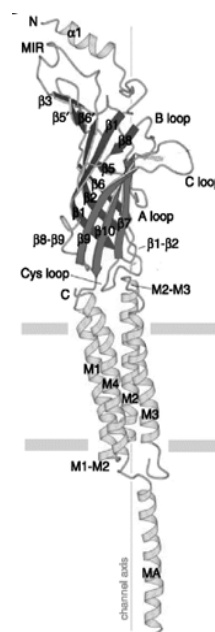
Sin embargo, en ninguno de los esquemas presentados anteriormente se incluye la *desensibilización*, estado del receptor en el que se muestra insensible a

concentraciones crecientes de ACh y el canal permanece cerrado en presencia continuada de él.

La desensibilización de los receptores nicotínicos fue caracterizada por primera vez en los de tipo muscular en 1957 (Katz y *col.*, 1957). Se trata de una propiedad intrínseca del canal (Ochoa y *col.*, 1989), aunque en condiciones fisiológicas es modulada por procesos celulares como la fosforilación (Huganir y *col.*, 1986) o por la presencia de compuestos como la sustancia P, co-liberada junto con las catecolaminas (Role, 1984; Zhou y *col.*, 1990). Algunas de sus características más importantes son: 1) se desarrolla de forma tiempo-dependiente y dosis-dependiente con respecto a la exposición al agonista; 2) la rapidez con que un nAChR se recupera de la desensibilización varía en función del agonista; 3) potencialmente, pero no necesariamente (sobre todo tras una exposición crónica al agonista), es completamente reversible; 4) la composición en subunidades del nAChR influye en sus características de desensibilización (p. ej: los nAChRs que contienen la subunidad $\alpha 7$ son los que se desensibilizan más rápidamente, en ms, frente a los nAChRs que no contienen $\alpha 7$, que lo hacen en s) (Giniatullin y *col.*, 2005).

Este fenómeno no está esclarecido aún y su papel en la transmisión sináptica es incierto. En cuanto a las implicaciones fisiológicas o patológicas de la desensibilización de los nAChRs, se conocen algunas de ellas, pero quedan aún muchas por esclarecer. Se pueden consultar más información sobre estas implicaciones en las revisiones de (Quick y *col.*, 2002) y (Giniatullin y *col.*, 2005).

Las estructuras que unen el sitio de unión al canal comienzan a descubrirse ahora. Una gran variedad de estudios indican que hay múltiples estructuras que acoplan la unión del agonista con la apertura del canal (Sine y *col.*, 2006). En el nAChR muscular, el paso inicial se inicia en una tríada de residuos localizados cerca del sitio de unión: α Tyr 190 y α Asp 200 dentro del lazo C que unen las hojas- β 9 y 10, y una α Lys 145 en la hoja- β 7 (Mukhtasimova y *col.*, 2005) (Fig. 8). Una vez que el agonista se une, el lazo C se inclina hacia el interior cubriendo al agonista (Celie y *col.*, 2004; Gao y *col.*, 2005; Hansen y *col.*, 2005), probablemente causando un reordenamiento de las hojas β -7, 9 y 10. Esta tríada de residuos se conserva en todos los nAChRs, pero diverge en otros receptores de las superfamilia con lazo Cys, sugiriendo que cada tipo de receptor de este grupo puede tener una diferente tríada de residuos implicados en la activación del primer paso. Además, la tríada dentro de la familia de los nAChRs



puede manifestar ligeras diferencias en sus efectos (Horenstein y *col.*, 2007). Los cambios conformacionales inducidos por la unión del agonista se propagan a lo largo de las interfases de la proteína, lo que activa una segunda secuencia de acontecimientos mediados por α Arg en la hoja- β 10, α Glu situada dentro de la secuencia de aminoácidos que enlaza las hojas β -1 y 2, y una Pro conservada en la secuencia de aminoácidos que une los dominios M2 y M3 (Kash y *col.*, 2003; Lyford y *col.*, 2003; Bouzat y *col.*, 2004; Chakrapani y *col.*, 2004; Lee y *col.*, 2005). Se acepta que esta segunda estructura es la principal ruta de acoplamiento y su localización sugiere que es el principal activador de la compuerta del dominio M2 para que se produzca el flujo iónico (Lee y *col.*, 2005). Una tercera estructura implicada en la activación del canal son una serie de aminoácidos hidrofóbicos localizados cerca del sitio de unión; sin embargo, esta estructura solo está presente en el nAChR muscular.

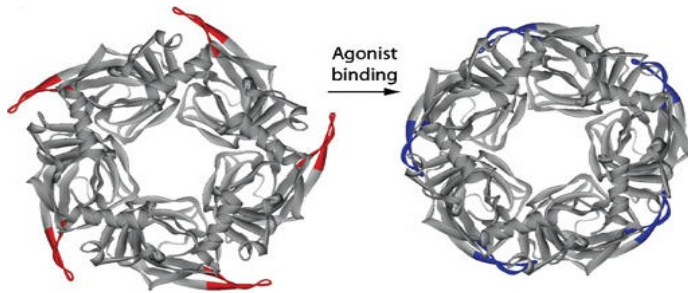


Fig. 8. Representación en cintas del dominio N-terminal del nAChR (izquierda) y de la subunidad $\alpha 1$ de *Torpedo* (derecha). En la figura de la izquierda se observa la posición del lazo Cys, visto desde arriba, antes y después de la unión de ACh. En ausencia de la ACh el lazo Cys (rojo) apunta hacia fuera; tras la unión de la molécula, el lazo Cys (azul) se mueve hacia el eje de simetría del canal del receptor comenzando la apertura del canal. En la figura de la derecha se representa la vista lateral de la subunidad $\alpha 1$ del nAChR de *Torpedo*. Los lazos A, B y C implicados en la unión de la ACh se indican en la parte derecha de la figura. Tras la unión del ligando, estos tres lazos transmiten la señal de activación a la región transmembrana (M1-M4) a través de las hojas $\beta 1$ - $\beta 2$, $\beta 8$ - $\beta 9$, $\beta 10$ y lazo Cys. (Adaptado de Hansen y *col.*, 2005).

1.5.1.-Segundo dominio transmembrana, M2

Tras la clonación de las subunidades de los receptores con lazo Cys, se asignó al dominio M2 un papel principal en la formación del poro conductor del flujo iónico. Se realizaron estudios usando quimeras formadas por subunidades del receptor del pez *Torpedo* y la subunidad δ del nAChR bovino que revelaron que el dominio M2 y la secuencia que une a los dominios M2 y M3 determinan la tasa del flujo iónico a través del nAChR $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ (Imoto y *col.*, 1988). Además, se observó que la afinidad de

bloqueadores voltaje dependientes podía verse afectada por mutaciones en el dominio M2 del nAChR (Leonard y col., 1988) y que cuando se mutaban aminoácidos polares de la secuencia enlazante M2-M3 la conductancia del canal cambiaba (Imoto y col., 1988). Posteriormente, se confirmó que las mismas propiedades del dominio M2 se conservaban en otros receptores con lazo Cys (Xu y col., 1993; Akabas y col., 1994; Xu y col., 1996; Reeves y col., 2001). Generalmente, cada tres aminoácidos del dominio M2 es hidrofílico y se localiza en el giro de una hélice- α (Unwin, 2005). Estos datos apuntan a que la estructura en hélice- α del dominio M2 deja a todos los residuos hidrofílicos en el mismo lado de la hélice, la luz del poro iónico.

La secuencia de aminoácidos del dominio M2 y de las regiones que lo flanquean de distintas subunidades de la superfamilia de receptores con lazo Cys se representan en la figura 9. Se revela como se conservan algunos residuos entre distintos tipos de receptores. El residuo Leu en posición 9' (de acuerdo con la numeración de (Miller, 1989) es el único aminoácido conservado en todos los receptores con lazo Cys (con excepción del 5HT3_B que posee una Val en esa posición) y se considera como una característica de esta clase de receptores. Otras posiciones también contienen aminoácidos con propiedades conservadas. Así, la posición 5' posee residuos hidrofóbicos como Ile o Val, la posición 6' y 12' poseen aminoácidos polares como Ser y Thr, mientras que en las posiciones -5' y 0' se localizan residuos con carga negativa y positiva, respectivamente. Dentro de cada familia de receptores, el dominio M2 está muy conservado lo que indica que es determinante para el tipo de flujo iónico que pasa a su través. Así, se ha observado que curiosamente la mayoría de los canales selectivos a cationes tienen un aminoácido menos en la secuencia enlazante M1-M2 que sus homólogos aniónicos.

El dominio M2 forma el poro por el cual debe discurrir el flujo iónico al mismo tiempo que debe discriminar los iones que pasan a su través. La estructura en hélices- α del dominio M2 sugiere que solo uno o dos tipos de cadenas laterales de los aminoácidos componen el canal (Unwin, 2005). Los nAChRs son canales catiónicos y discriminan escasamente entre cationes monovalentes (Huang y col., 1978; Cohen y col., 1992; Bertrand y col., 1993). También, en el nAChR se observa conductancia para el ión calcio, en especial en el subtipo $\alpha 7$ (Bertrand y col., 1993) pero la mayor parte del flujo iónico *in vivo* se lleva a cabo por iones sodio y potasio. Se ha estimado el diámetro de la parte más estrecha del poro iónico de los nAChRs., siendo de aproximadamente 3 Å. La unión del ligando al receptor provoca los cambios conformacionales descritos en apartados anteriores, que incrementan el diámetro a 8Å (Albuquerque y col., 2009)

| | M1 | M1-M2 loop | M2 |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----|
| | | Intermediate ring | |
| | | Cytoplasmic ring | |
| | | Polar ring | |
| | | Extracellular ring | |
| Cation channels | -5' | -1' | 2' |
| nAChR α | LPTDSG | EKMTLSISVLLSLTVFLLVIVELIPS | |
| nAChR β | LPPDAG | EKMGLSIFALLTLTVFLLLLADKVPE | |
| nAChR δ | LPADSG | EKTSVAISVLLAQSVFLLLISKRLPA | |
| nAChR γ | LPAKAGGQKCTVAINVLLAQTVFLFLLAKKVPE | | |
| nAChR α_4 | LPSECG | EKITLCISVLLSLTVFLLLITEIIPS | |
| nAChR α_7 | LPADSG | EKISLGITVLLSLTVFMLLVAEIMPA | |
| nAChR β_2 | LPSDCG | EKMTLCISVLLALTIVFLLLISKIVPP | |
| 5-HT _{3A} R | LPPNSG | ERVSFKITLLLGYSVFLIIVSDTLPA | |
| Anion channels | | | |
| GlyR α_1 | INMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASLPK | | |
| GlyR β | INPDASAARVPLGIFSVLSLASECTTLAAELPK | | |
| GABA _A R $\alpha_{1-3;5}$ | LNRESVPARTVFGVTTVLTMTTSLISARNSLPK | | |
| GABA _A R β_{2-3} | INYDASAARVALGITTTLTMTTINTHLRETLPK | | |
| GABA _A R γ_{1-2} | INKDAVPARTSLGITTTLTMTTSLTIARKSLPK | | |
| GABA _A R ρ_1 | IDRRVAPARVPLGITTTLTMTSTIITGVNASMPR | | |

Fig. 9. Alineamiento de las secuencias enlazantes de M1-M2 y del dominio M2 de distintos tipos de subunidades de la superfamilia de receptores con lazo Cys. Todas las secuencias pertenecen a receptores humanos. Los anillos cargados aparecen marcados mediante flechas y la numeración se ha realizado de acuerdo a Miller (1989). El anillo intermedio implicado en la selectividad iónica se muestra en gris. Adaptado de (Jensen y col., 2005).

Los primeros estudios dirigidos a la identificación de los aminoácidos implicados en la selectividad iónica del canal se llevaron a cabo en el nAChR de *Torpedo* (Imoto y col., 1988). Se identificaron tres agrupaciones de residuos cargados negativamente en el dominio transmembrana M2 que formaban tres anillos aniónicos, constituyendo los principales elementos que determinan la conductancia del nAChR. Estos anillos se denominaron extracelular (20'), intermedio (-1') y citoplásmico (-5'), tal y como se representa en la figura 10. Además, se observó que el anillo intermedio constituía un estrechamiento en el canal. Estudios sobre el papel de este anillo demostraron que las cadenas laterales de los aminoácidos que lo forman entran en contacto estrecho con los cationes que fluyen a través del poro, por lo que posiblemente constituya un filtro selectivo (Konno y col., 1991).

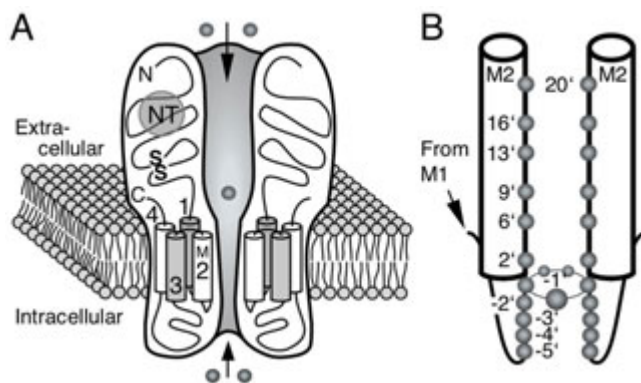


Fig. 10. Representación del poro iónico de los receptores con lazo Cys. (A) Vista lateral esquemática del canal del receptor. Dos de las cinco subunidades se representan para mostrar el poro del canal inmerso en la membrana plasmática. Todas las subunidades de las superfamilia de receptores con lazo Cys comparten la misma topología transmembrana y una secuencia de aminoácidos similar. El dominio M2 forma el poro del canal. (B) Vista de la posición de los aminoácidos que forman la pared del poro (-1' a 20'). La numeración se realiza respecto a la posición considerada como el primer residuo del dominio M2. Los residuos numerados de -1 a -5 forman parte del lazo que conecta los dominios M1 y M2 (Paas y col., 2005).

Posteriormente, se demostró que en el nAChR $\alpha\beta\gamma\delta$ los aminoácidos en posición 2' también estaban implicados en el estrechamiento del poro iónico (Imoto y col., 1991; Villarroel y col., 1991). Este anillo se localiza a 0,8 vueltas del anillo intermedio y se denomina anillo polar ya que los aminoácidos Thr y Ser ocupan a menudo esta posición. Mutaciones de los residuos polares en la posición 2' a Val redujeron la conductancia a nivel de canal único del nAChR (Imoto y col., 1991) y se observó una relación inversa entre el tamaño de la cadena lateral del residuo introducido y los niveles de conductividad del canal. Estudios realizados en el nAChR muscular de rata confirmaron la importancia del anillo polar, ya que se observaron claros cambios en la conductancia de distintos iones alcalinos con las mutaciones realizadas en la posición 2' (Villarroel y col., 1991; Villarroel y col., 1992). Sin embargo, las mutaciones realizadas en otras posiciones del dominio M2 no mostraron cambios significativos a nivel de conductancia, sugiriendo que debía existir un diámetro más ancho en las posiciones 4', 6', 10' y 12' (Imoto y col., 1991). Todos estos resultados sugieren que los residuos polares en posición 2' del canal de nAChR participan en la deshidratación de los cationes al proporcionar un grupo polar como sustituto de las moléculas de agua que impregnan al catión (Imoto, 1993).

1.5.2.-Efecto de la mutación de residuos en el dominio M2

De todos los residuos del dominio M2, la leucina en la posición 9' es el residuo más conservado a lo largo de la superfamilia de receptores con lazo Cys. Se ha sugerido que L9' funciona como una compuerta del canal a través de la asociación con otra L9', formando un estrechamiento durante el estado cerrado del canal (Unwin, 1995). La unión del agonista al receptor induce cambios conformacionales que desfavorecen la formación del anillo, y la interrupción de este crea la configuración de canal abierto del poro. Por otro lado, Changeux y colaboradores (Revah y col., 1991; Bertrand y col., 1992) han propuesto que L9' de cada subunidad se mueve hacia el lumen del canal durante la desensibilización del receptor para ocluir el poro. Esta hipótesis se basa en los resultados obtenidos en los estudios sobre el nAChR $\alpha 7$ homomérico donde la L9' fue sustituida por un residuo de treonina. Esta sustitución reduce notablemente la velocidad de desensibilización del receptor y desplaza la curva concentración-respuesta de la ACh hacia menores concentraciones de agonista, además de observarse un estado de conductancia adicional del canal mutado, pero no en los receptores silvestres. Estos cambios se atribuyeron a que la treonina convertiría el estado desensibilizado normalmente no conductor en uno conductor.

Otros estudios sobre el nAChR muscular arrojaron luz sobre los efectos de la mutación L9' a treonina. Un efecto importante de esta sustitución es la de estabilizar el estado abierto del canal mediante la disminución de la velocidad de cierre del mismo (Filatov y col., 1995). Esta estabilización desplaza la curva concentración-respuesta de ACh hacia concentraciones más bajas de agonista al favorecer el equilibrio abierto/cerrado hacia el estado abierto. La disminución de la tasa de desensibilización fue resultado de la estabilización del estado abierto. Como ya se ha comentado, según el modelo de Unwin L9' mantendría el canal cerrado por medio de interacciones leucina-leucina de subunidades distintas. Así, la mutación L9' a treonina probablemente debilita dichas interacciones que estabilizan el estado abierto del canal. Además, Kosolapov y colaboradores (Kosolapov y col., 2000) demostraron que cuando el canal se abre, las leucinas se mueven en un entorno poco polar, de manera que el tiempo de residencia en esta posición, y por tanto el tiempo en que el canal permanece abierto, depende de la polaridad del aminoácido. La sustitución por la treonina polar estabiliza este tipo de interacción, lo que conduce a un estado abierto de mayor duración que el observado en el canal silvestre (Filatov y col., 1995).

1.6.-RECEPTORES NICOTÍNICOS NEURONALES

A pesar del amplio trabajo realizado sobre la unión neuromuscular de vertebrados y de toda la información obtenida de la estructura de los nAChRs mediante el estudio del receptor de *Torpedo* y de la AChBP, aún se desconoce mucho sobre la composición de subunidades, ensamblaje y función de los receptores nicotínicos neuronales. No obstante, durante los últimos años la aplicación de técnicas moleculares, fisiológicas e inmunológicas ha demostrado ser muy útil en el estudio de estos receptores en el sistema nervioso central y periférico. Además, la posible implicación del nAChR neuronal en un número de condiciones patológicas y su papel en la analgesia, la sensación de dolor y neuroprotección (Paterson y col., 2000) han aumentado el interés de muchos laboratorios en estudiar estos receptores.

Los conocimientos obtenidos a partir del estudio de los nAChRs musculares y el uso de nuevas técnicas condujo a la identificación y clonación de los genes que codifican subunidades nicotínicas neuronales y a la purificación de receptores nativos (Sargent, 1993; McGehee y col., 1995; Corringer y col., 2000). Los estudios previos a la identificación de las subunidades ya mostraban que los receptores eran muy diversos y que no podían compararse con el receptor de tipo muscular a pesar de que algunas de sus propiedades eran similares, como su selectividad iónica, la estructura pentamérica y las propiedades de activación periódica (Sargent, 1993). La primera evidencia farmacológica que mostró una diferencia entre los nAChRs neuronales y el subtipo muscular se presentó en el trabajo realizado por (Paton y col., 1949), donde observaron diferencias en la sensibilidad de estos tejidos para el antagonista decametonio. En estos primeros estudios también se vio que agonistas tales como ACh o la nicotina podían unirse a ambos tipos de receptores, sin embargo la ACh era menos eficaz que la suberildicolina en el tipo muscular y el DMPP (dimetilfenilpiperazinio) era un agonista selectivo de los nAChR neuronales. Sin embargo, el uso de la α -bungarotoxina, un bloqueador competitivo con alta afinidad para el nAChR muscular, demostró ser ineficaz para el aislamiento de los receptores neuronales ya que la toxina era incapaz de unirse a nAChRs autónomos (Romano y col., 1980; Sargent, 1993; McGehee y col., 1995; Corringer y col., 2000).

La primera clonación de una subunidad nicotínica neuronal se realizó a finales de los años 80 (Boulter y col., 1986); en los años siguientes la tecnología del ADN recombinante condujo a la identificación de todos los genes conocidos hoy (Couturier y col., 1990b; Anand y col., 1992; Chini y col., 1992; Raimondi y col., 1992; Sargent, 1993; McGehee y col., 1995). Doce subunidades neuronales diferentes se han identificado en vertebrados hasta ahora ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ y $\beta 2$ - $\beta 4$) y todos ellos se parecen a

las subunidades musculares en su secuencia de aminoácidos y estructura secundaria; las subunidades α contienen las dos cisteínas adyacentes características de la superfamilia y que forman un enlace disulfuro en el extremo N-terminal, mientras que las subunidades β (o no- α , tal como aparecen a veces en la literatura) no las poseen. Las subunidades están amplia y diferencialmente distribuidas en el sistema nervioso central y periférico (SNC y SNP); así por ejemplo, las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ se encuentran principalmente en el SNP, incluyendo células cromafines suprarrenales y ganglios autónomos, y otras subunidades como las $\alpha 4$ y $\beta 2$ son más abundantes en el SNC.

Desde la clonación de los genes, se ha realizado un gran esfuerzo en definir la composición de los receptores nativos en las neuronas. Un método ampliamente utilizado consiste en expresar combinaciones de subunidades clonadas en sistemas de expresión heterólogos (ovocitos de *Xenopus* y líneas celulares de mamíferos) para estudiar las propiedades en términos de composición de subunidades, estequiometría, fisiología y farmacología de los receptores formados y comparar los resultados con los obtenidos a partir de los sistemas nativos. Este tipo de estudios han establecido algunas "reglas" sobre el ensamblaje de las subunidades que ayudaron a limitar el gran número teórico de los subtipos de nAChR neuronales que pudieran existir *in vivo* (ver Fig. 11). Así por ejemplo, las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ forman receptores homoméricos funcionales cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus* (Couturier y col., 1990a; Elgoyhen y col., 1994); las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$ necesitan ser coexpresadas bien con una subunidad $\beta 2$ o con una $\beta 4$ (McGehee y col., 1995); la subunidad $\alpha 6$ también puede formar receptores funcionales si se coexpresa con las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ a la vez (Fucile y col., 1998). Las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ sólo pueden formar receptores funcionales cuando se expresan como tripletes con una α y con una subunidad β a la vez: $\alpha 5$ se puede combinar con $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$ (Ramirez-Latorre y col., 1996; Wang y col., 1996; Sivilotti y col., 1997; Groot-Kormelink y col., 2001) y $\beta 3$ con $\alpha 3\beta 4$ (Groot-Kormelink y col., 1998; Boorman y col., 2000). Por último, la subunidad $\alpha 10$ más recientemente identificada, es incapaz de formar receptores homoméricos por sí misma, produciendo receptores funcionales cuando se coexpresa con la subunidad $\alpha 9$ (Elgoyhen y col., 2001; Sgard y col., 2002; Baker y col., 2004). Además, gracias a nuevas aproximaciones y técnicas de biología molecular aplicados a los sistemas de expresión heteróloga, como son la utilización de subunidades del nAChR con la mutación reportera L9'T insertada en el dominio M2, la coinyección de subunidades en una proporción extrema y el uso de concatémeros de las subunidades en un orden predefinido, se ha llegado a determinar posibles estequiometrías alternativas de varios subtipos de nAChRs, como es el caso de los

receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ (Moroni y col., 2006; Carbone y col., 2009; Krashia y col., 2010).

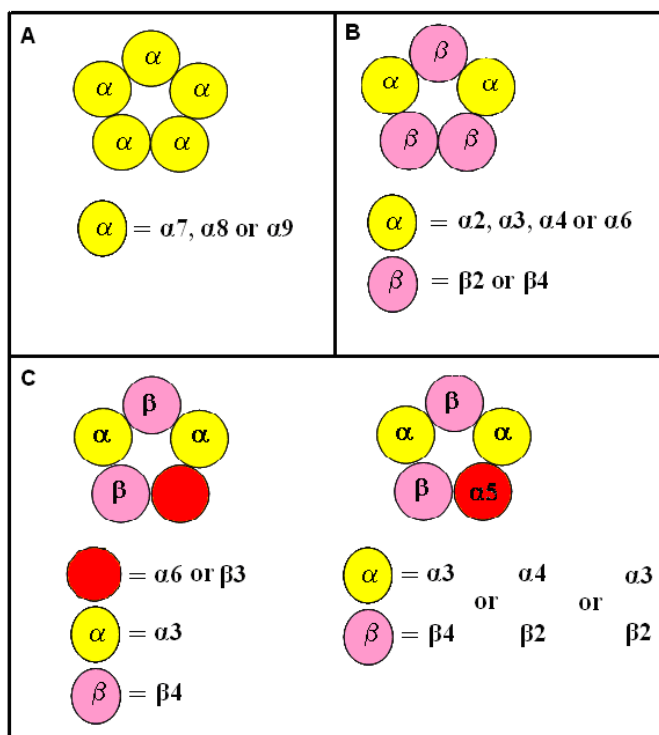


Fig. 11 Expresión de receptores nicotínicos recombinantes en ovocitos de *Xenopus*: algunas reglas de ensamblaje. (A) Receptores homoméricos funcionales se pueden reproducir mediante la expresión de subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$ aisladas. (B) Receptores heteroméricos con dos subunidades distintas que se pueden formar mediante la co-expresión de subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$ con subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$. (C) Receptores heteroméricos con tres subunidades distintas que se pueden formar si las subunidades $\alpha 6$ o $\beta 3$ se coexpresan con los receptores $\alpha 3\beta 4$, o si la subunidad $\alpha 5$ se combina con los receptores $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$.

Sin embargo, se ha sugerido que la capacidad de combinación entre las subunidades examinadas sea más permisiva *in vivo* que en sistemas de expresión heteróloga, sin descartar la existencia de otras subunidades del receptor nicotínico neuronal no identificadas, ya que en pocos casos existe una correlación entre las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los receptores expresados heterológamente de las registradas *in vivo*. Dependiendo de la combinación de subunidades, el receptor formado puede cambiar tanto su afinidad por ciertos fármacos y algunos de sus parámetros electrofisiológicos, como presentar propiedades nuevas. En apartados posteriores se presentarán las posibilidades estequiométricas de los nAChRs neuronales de mamífero resultantes de la combinación de distintas técnicas

1.6.1.-Evolución de las subunidades nicotínicas

La secuenciación de los genes que codifican los receptores nicotínicos reveló un alto grado de diversidad; los nAChRs, tanto de tipo muscular como neuronal, están ampliamente distribuidos en todo el reino animal, desde nematodos a mamíferos. En los vertebrados las subunidades se pueden dividir en cuatro subclases filogenéticas distintas basándose en su secuencia, semejanza y estructura de los genes (Fig. 12).

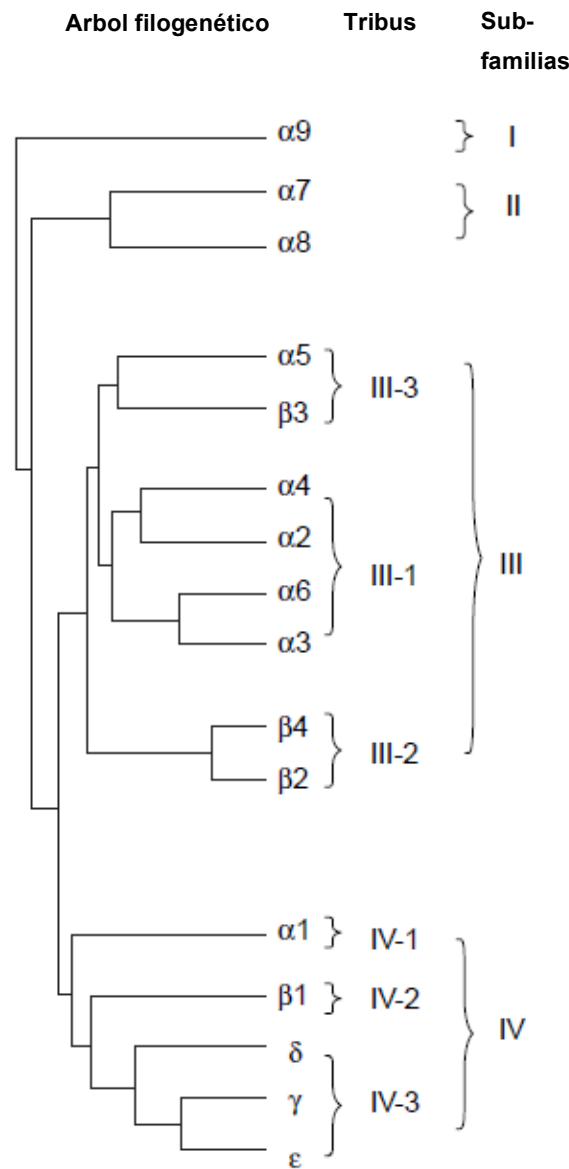


Fig 12. El árbol filogenético de las subunidades nicotínicas. Todas las subunidades identificadas hasta ahora se pueden clasificar en cuatro subclases según la homología de sus secuencias y su semejanza estructural (Cordero-Erausquin y *col.*, 2000). La subunidad $\alpha 10$ no mostrada en la figura, pertenecería a la subfamilia I, junto con la subunidad $\alpha 9$ (Le Novere y *col.*, 2002).

El gran número de genes existentes actualmente es producto de una serie de duplicaciones del genoma que comenzó hace más de 500 millones de años, con el inicio de evolución de los vertebrados (Le Novère y col., 2002) y de duplicaciones más recientes (400 millones de años) que dieron lugar a las subunidades neuronales y musculares actuales, y se estabilizaron con la aparición de los tetrápodos. Durante ese período se perdieron genes en algunas clases de vertebrados: por ejemplo la subunidad $\alpha 8$, que está presente en las aves pero no en los mamíferos, y la subunidad muscular ϵ que está ausente en aves.

Comparadas con otras subunidades nicotínicas, las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ parecen ser las más primitivas (Ortells y col., 1995), junto con la subunidad $\alpha 10$. Estas se separaron más tempranamente durante la evolución lo que puede explicar su capacidad para formar receptores homoméricos ($\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$) y heteroméricos entre sí ($\alpha 7$ con $\alpha 8$; $\alpha 9$ y $\alpha 10$) cuando se expresan en ovocitos de *Xenopus* (Couturier y col., 1990a; Le Novère y col., 2002). Estos receptores se parecen a los de tipo 5-HT₃ (también homoméricos), de aparición anterior y es muy probable que todos ellos compartan el mismo ancestro.

Seguida a la aparición de las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ evolucionaron las subunidades β que carecen del par de cisteínas adyacentes y el resto de las subunidades α . La pérdida del par de cisteínas podría haberse producido tras la duplicación del ancestro común seguida de una mutación en uno de los dos genes y la evolución independiente de los genes α y no- α . La semejanza en la secuencia de aminoácidos de las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ y la evidencia de que pueden formar receptores funcionales en ovocitos sólo cuando se expresan como tripletes muestran que están estrechamente relacionadas. Es probable que la subunidad $\beta 3$ evolucionara de la misma manera que las otras subunidades β , tras la duplicación de un ancestro común $\alpha 5$ - $\beta 3$ que era también una subunidad α . Parece ser que tanto las subunidades α y β (con la excepción de $\beta 3$) evolucionaron en la misma época de forma independiente en los subtipos musculares y neuronales, de acuerdo con Ortells y Lunt (1995). Desde entonces las subunidades musculares y neuronales han continuado evolucionando de forma independiente y, aunque la evolución es lenta, es lógico asumir que cada una ha sido objeto de selección natural (Le Novère y col., 2002).

1.7.-Subtipos, distribución y posibilidades estequiométricas de los nAChRs neuronales nativos.

Como su propio nombre indica, los receptores nicotínicos neuronales aparecen localizados en células del sistema nervioso. Los receptores presentes en tejidos neuronales están principalmente localizados en sitios presinápticos o preterminales,

donde modulan la liberación de neurotransmisores (McGehee y *col.*, 1995), y también en el soma neuronal o en las dendritas, donde median efectos postsinápticos como la despolarización (Frazier y *col.*, 1996; Zhang y *col.*, 1996; Conroy y *col.*, 1999). Existe una opinión generalizada de que la localización presináptica es la más relevante desde un punto de vista fisiológico (Sher y *col.*, 2004; Jensen y *col.*, 2005).

En un esfuerzo por dilucidar qué combinaciones se expresan en el organismo y cual es su distribución, se han utilizado estrategias basadas en técnicas de hibridación *in situ* y RT-PCRs para determinar las regiones anatómicas en las que existe una co-localización de los transcritos de varias subunidades. De manera adicional, las técnicas de unión de radioligandos, de inmunopurificación y co-inmunoprecipitación, unidas a la generación de ratones “knockout” y transgénicos para distintos nAChRs han sido útiles para identificar interacciones entre subunidades y los patrones de distribución de los distintos subtipos de receptores nicotínicos en mamíferos (Gotti y *col.*, 2006b) (ver Fig. 13).

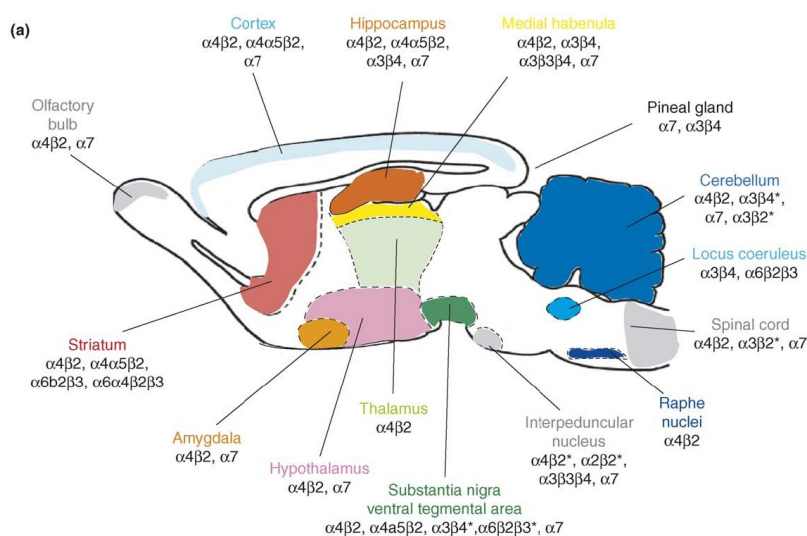


Fig. 13. Distribución regional de los principales subtipos del nAChR en el SNC de roedores. Los subtipos presentes en el córtex, cerebelo, hipocampo, núcleo interpeduncular, habénula media y glándula pineal han sido identificados por estudios de unión, inmunoprecipitación, y/o inmunopurificación en tejidos de rata y/o ratones controles y/o “knockout”. Los subtipos presentes en la amígdala, hipotálamo, locus coeruleus, bulbo olfatorio, núcleo del rafe, médula espinal, sustancia nigra, área tegmental ventral y tálamo han sido deducidos por hibridación *in situ*, PCR en célula única y estudios de unión en tejidos obtenidos de rata y/o ratón controles y/o “knockout” (Gotti y *col.*, 2006).

En cerebro, principalmente se localizan receptores heteroméricos que contienen solo un tipo de subunidad α y otro tipo de subunidad β , aunque también se encuentran receptores $\alpha 7$ homoméricos (Gotti y *col.*, 2004; Albuquerque y *col.*, 2009). De los

primeros, el subtipo más abundante y ampliamente distribuido es el $\alpha\beta 2$, mientras que el receptor $\alpha\beta 4$ se restringe a determinados grupos celulares. En el cerebro del primate *Macaca mulatta*, la amplia distribución de la subunidad $\alpha 2$ es comparable a la de $\alpha 4$ (Han y col., 2000), lo que contrasta con lo que sucede en roedores (Han y col., 2000; Han y col., 2003; Moretti y col., 2004; Grady y col., 2009).

A continuación, se enumeran algunas características de las subunidades que forman los receptores nicotínicos neuronales, clasificados en dos grupos dependiendo de su capacidad de unión a α -bungarotoxina.

- **Receptores que no unen α -bungarotoxina**

El receptor $\alpha 4\beta 2$

Las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ representan el 90% de los nAChRs de alta afinidad por nicotina en el cerebro de los mamíferos (Whiting y col., 1991; Gotti y col., 2006b) y presentan una co-localización casi coincidente. Se encuentran en la corteza, bulbo olfatorio, hipocampo, habénula media, tálamo, hipotálamo, amígdala, cuerpo estriado, núcleo interpeduncular, sustancia negra, área tegmental ventral, cerebelo, médula espinal y en el núcleo del rafe. Además, existen múltiples subtipos de este receptor puesto que puede incorporar otras subunidades adicionales como la $\alpha 5$ en la corteza, hipocampo, tálamo, cuerpo estriado, sustancia negra, área tegmental ventral y la vía visual (retina, núcleo lateral geniculado y colículo superior) (Ramírez-Latorre y col., 1996; Brown y col., 2007). El receptor $\alpha 4\beta 2^*$ contiene la subunidad $\alpha 6$ en el cuerpo estriado de la rata (Zoli y col., 2002) y en la vía visual, representando el 40-60% de todos los receptores $\alpha 6^*$. Por el contrario, tanto la subunidad $\alpha 4$ como la $\beta 2$ se expresan escasamente en el SNP.

Los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 2$

La subunidad $\alpha 3$ forma parte de numerosos tipos de receptores ($\alpha 3\beta 2^*$ y $\alpha 3\beta 4^*$) principalmente en el SNP pero también en el SNC (Whiteaker y col., 2002). El receptor periférico (ganglionar) por excelencia es el $\alpha 3\beta 4$ aunque se encuentra también en la habénula media, núcleo interpeduncular, médula espinal, glándula pineal (Hernández y col., 2004) y la retina (Marriott y col., 2005). Puede incluir la subunidad $\alpha 5$ (Wang y col., 1996) que incrementa la permeabilidad al calcio, la afinidad por los agonistas y la desensibilización. Por ejemplo, en el ganglio ciliar de pollo se ha detectado la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 4$ y $\alpha 5$ en un mismo receptor (Conroy y col., 1995), incorporando también la subunidad $\beta 2$; y se ha determinado la expresión de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 4$ y $\alpha 5$ en células cromafines (Criado y col., 1992; Campos-Caro y col., 1997) y en células PC12 (Boulter y col., 1990; Couturier y col., 1990b; Rogers y

col., 1992; Corriveau y col., 1993; Mandelzys y col., 1994). También pueden incluir la subunidad $\beta 3$ (núcleo interpeduncular y habénula media).

El receptor $\alpha 3\beta 2$ se encuentra en la médula espinal pero puede incluir otras subunidades en su estructura ($\alpha 3\beta 2^*$) en la habénula media, el cerebelo, la médula espinal, en la vía visual y en el ganglio cervical superior (Millar y col., 2009).

Los receptores $\alpha 2\beta 2$

La subunidad $\alpha 2$ muestra una expresión diferencial dentro del SNC, de acuerdo a los experimentos de hibridación *in situ* realizados en algunas especies. En roedores, la localización de esta subunidad se ha observado en el núcleo interpeduncular (Wada y col., 1989). Los estudios realizados en cerebro de mono revelan una amplia expresión en estructuras como el tálamo, la glándula pineal y el hipocampo (Han y col., 2000). Los resultados obtenidos en pollo muestran elevados niveles de expresión en el núcleo lateral espiciforme (Daubas y col., 1990) y en la habénula (Brussaard y col., 1994). En el lóbulo óptico de esta especie, se ha identificado a la subunidad $\alpha 2$ formando parte de receptores $\alpha 2\beta 2\alpha 5$ (Balestra y col., 2000).

Los receptores $\alpha 6^$*

La subunidad $\alpha 6$ posee una distribución restringida en áreas del SNC. Parece ser que los receptores $\alpha 6^*$ se concentran en neuronas catecolaminérgicas (Le Novère y col., 1996; Goldner y col., 1997) de determinadas áreas cerebrales como el área tegmental ventral ($\alpha 6\beta 2^*$, $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$), locus coeruleus ($\alpha 6\beta 2\beta 3$) (Zoli y col., 2002; Moretti y col., 2004; Salminen y col., 2007) y retina ($\alpha 6\beta 2$, Moretti y col., 2004; $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\alpha 6\beta 3\beta 4$, $\alpha 6\beta 4$, (Vailati y col., 1999). En la vía mesoestriatal y visual de los roedores, los receptores $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ representan más de la mitad de todos los receptores $\alpha 6^*$ y presentan diferente afinidad y sensibilidad frente al antagonista α -Ctx-MII (Zoli y col., 2002). La presencia de estos receptores en el estriado está conservada entre especies (roedores y primates) aunque con algunas diferencias en la composición (Gotti y col., 2006^a; Bordia y col., 2007). Los receptores $\alpha 6^*$ de la retina de mamíferos solo se asocian prácticamente con la subunidad $\beta 2$ (Moretti y col., 2004; Marritt y col., 2005), mientras que en la retina de pollo adulto los receptores $\alpha 6^*$ presentan la subunidad $\beta 4$ (Vailati y col., 1999).

Las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$

La subunidad $\alpha 5$ parece comportarse como una subunidad β dentro del receptor del que forma parte. De hecho, la estequiometría del receptor $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ podría ser de $\alpha 3(2):\beta 4(2):\alpha 5(1)$, donde ésta última actuaría como una subunidad β más (Groot-Kormelink y col., 2001). Aunque su expresión es tenue en el SNC, se trata de la

subunidad nicotínica que presenta una mayor distribución en tejidos no neuronales, siendo máxima a lo largo de todo el tubo digestivo, en el timo y en los testículos (Flora y col., 2000^a; Flora y col., 2000b). Esta subunidad también se ha identificado en timocitos y queratinocitos (Mihovilovic y col., 1993; Grando y col., 1996), habiéndose demostrado en el último caso la presencia de receptores nicotínicos funcionales.

La subunidad $\beta 3$ se consideró una subunidad huérfana (como ocurrió con la subunidad $\alpha 6$) hasta la co-transfección del ADNc de $\beta 3$ con $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ en cultivos de células COS (Forsayeth y col., 1997). Al igual que $\alpha 5$, se presenta en una sola copia en el receptor $\alpha 3\beta 4\beta 3$ (Boorman y col., 2000). En retina de pollo se asocia a dos poblaciones diferentes: una que contiene $\alpha 6$ y $\beta 4$, y otra que contiene $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$, lo que permite muchas combinaciones posibles (Vailati y col., 2000). Por tanto, $\beta 3$ y $\alpha 5$ son hasta la fecha las subunidades con mayor grado de promiscuidad. En el SNC de mamíferos, la subunidad $\beta 3$ se expresa de forma muy restringida y escasa en la sustancia nigra y habénula media (Deneris y col., 1989; Han y col., 2000; Quik y col., 2000).

- **Receptores que unen α -bungarotoxina**

Las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$ constituyen una subfamilia de nAChRs que, al igual que el nAChR muscular, presentan una alta afinidad por la toxina peptídica α -bungarotoxina (α -Bgt), componente activo del veneno de la serpiente *Bulgaria multicinctus*. De hecho, algunos receptores habían sido caracterizados previamente a su denominación de nicotínicos como proteínas de unión de α -Bgt dentro del SNC (Schoepfer y col., 1990).

Los receptores $\alpha 7^$*

El receptor $\alpha 7$ homomérico (Couturier y col., 1990^a; Drisdell y col., 2000) es el más abundante en distintas localizaciones del cerebro (córtex, hipocampo, amígdala, hipotálamo, área tegmental ventral, núcleo interpeduncular, habénula media, glándula pineal) aunque se han encontrado evidencias de que la subunidad $\alpha 7$ puede formar receptores heteroméricos funcionales con otras subunidades, por ejemplo $\alpha 8$ en el sistema nervioso de pollo (Anand y col., 1993; Keyser y col., 1993; Gotti y col., 1997); $\beta 2$ en el cerebro de rata (Murray y col., ; Khiroug y col., 2002; Azam y col., 2003; Liu y col., 2009); o $\beta 3$ expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus* (Palma y col., 1996).

El receptor $\alpha 7$ homomérico se caracteriza por su rápida cinética de activación e inactivación y por su bloqueo irreversible por α -Bgt (Couturier y col., 1990^a). Destaca su alta permeabilidad a calcio (Seguela y col., 1993) que lo equipara a los receptores

de NMDA. Regula a nivel presináptico la liberación de neurotransmisores (McGehee y col., 1995), y a nivel postsináptico sus características cinéticas le permite mediar una transmisión sináptica rápida (Zhang y col., 1996; Alkondon y col., 1998; Frazier y col., 1998b; Chang y col., 1999). Además, se ha encontrado en localizaciones distintas al SNC: nivel ganglionar, linfocitos, piel y epitelio pulmonar (Garcia-Guzman y col., 1995; Sharma y col., 2002; Grando, 2008; Wessler y col., 2008).

Los receptores $\alpha 8^$*

La subunidad $\alpha 8$ es el subtipo mayoritario presente en la retina de pollo, aunque también se expresa ampliamente en el cerebro de dicha especie. Son en estas regiones donde las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 8$ forman receptores heteroméricos, aunque menos representados que los receptores compuestos por cada una de las dos subunidades por separado (Anand y col., 1993; Keyser y col., 1993; Gotti y col., 1994; Gotti y col., 1997). No se han encontrado receptores ortólogos en mamíferos.

Los receptores $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$

Las subunidades $\alpha 9$ tienen una expresión muy localizada en las células ciliadas de la cóclea, el epitelio vestibular, el epitelio nasal, el pars tuberalis de la hipófisis, el músculo de lengua, el músculo esternohioideo y en queratinocitos (Elgoyhen y col., 1994; Zuo y col., 1999; Nguyen y col., 2000; Sgard y col., 2002). La expresión de esta subunidad dentro del sistema nervioso ha sido localizada en el ganglio de la raíz dorsal (Lips y col., 2002).

La subunidad $\alpha 10$ ha sido la última en ser clonada. Se ha identificado, junto con $\alpha 9$, en el oído de mamíferos, en la hipófisis y en queratinocitos, aunque no se ha encontrado en la lengua. No es capaz de formar receptores homoméricos por sí sola, pudiéndose expresar en ovocitos de *Xenopus* cuando se coinyecta con $\alpha 9$. Por el contrario, la subunidad $\alpha 9$ forma receptores homoméricos en sistemas de expresión heteróloga, pero la adición de la subunidad $\alpha 10$ modifica las propiedades originales del receptor homomérico (Elgoyhen y col., 2001; Sgard y col., 2002).

El receptor $\alpha 9\alpha 10$ parece estar implicado en el proceso auditivo (Elgoyhen y col., 2001; Katz y col., 2004; Vetter y col., 2007); Katz y col., 2004; Vetter y col., 2007) y en la transmisión del dolor de origen inflamatorio dado que se expresa en los ganglios de la raíz dorsal y en linfocitos (Vincler y col., 2006).

1.8.-Farmacología de los nAChRs neuronales

Gracias a las técnicas de biología molecular y de mutagénesis dirigida en combinación con técnicas electrofisiológicas, ha sido posible la identificación de determinados aminoácidos implicados en los procesos de reconocimiento de los diferentes fármacos existentes. Además del sitio de unión del agonista, donde también pueden unirse antagonistas competitivos, se han sido descritos otros sitios de unión para fármacos no competitivos, tanto agonistas como antagonistas, y para otras sustancias moduladoras (Paterson y *col.*, 2000) (**Fig. 14**).

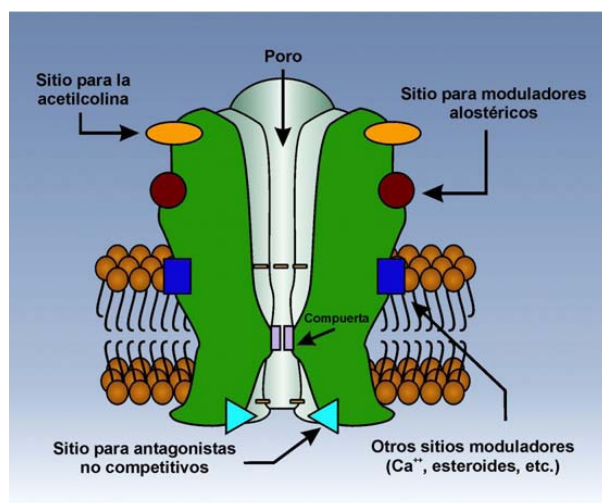


Fig. 14. Sitios de unión para diferentes ligandos (agonistas, antagonistas y moduladores) en el nAChR.

La combinación de subunidades presentes en un determinado receptor no sólo determina su especificidad funcional, sino también un perfil farmacológico característico. La afinidad por un ligando agonista viene determinada por los residuos hidrofóbicos del componente primario, mientras que los residuos presentes en el componente complementario determinan la selectividad del ligando. Sin embargo, la inclusión de una quinta subunidad determinada también parece afectar a la sensibilidad frente a agonistas. Por ejemplo, los receptores con subunidades $\alpha 5$ presentan bastantes diferencias respecto a los que no los contienen, en cuanto a propiedades del poro, sensibilidad a los agonistas y cinética de desensibilización (Ramírez-Latorre y *col.*, 1996; Wang y *col.*, 1996; Gerzanich y *col.*, 1998; Yu y *col.*, 1998^a); la inclusión de la subunidad $\beta 3$ en el receptor $\alpha 3\beta 4$ aumenta también la velocidad de desensibilización (Boorman y *col.*, 2000; Boorman y *col.*, 2003); la subunidad $\alpha 6$ confiere propiedades farmacológicas únicas, especialmente respecto a la afinidad aparente y eficacia de algunos agonistas (Gerzanich y *col.*, 1997). Recientemente, se ha visto en el receptor $\alpha 4\beta 2$ que la inclusión de una quinta subunidad $\alpha 4$ o $\beta 2$ afecta notablemente la sensibilidad a Ach y a otros agonistas

(Nelson y col., 2003; Moroni y col., 2006). Parece ser que la quinta subunidad tiene algún tipo de efecto sobre la unión de los ligandos, a pesar de no participar en los sitios de unión.

1.8.1.-Agonistas de los nAChRs

Los agonistas se definen como compuestos que se unen al sitio de unión a ACh para producir la activación del canal del nAChR. Generalmente son compuestos de amonio cargados positivamente, ya que las interacciones electrostáticas con los receptores favorecen compuestos con un núcleo con carga positiva (Swanson y col., 1992). Por homología con el nAChR de *Torpedo*, se cree que los nAChRs heteroméricos poseen dos sitios de unión que actúan con una cooperación positiva según el modelo alostérico, por lo que ambos sitios deben ser ocupados por el agonista para inducir la apertura del canal del receptor. Para los nAChRs homoméricos, se ha pensado durante mucho tiempo que los agonistas debían ocupar los cinco sitios de unión presentes en la molécula pentamérica, sin embargo se ha demostrado mediante la creación de un receptor quimérico $\alpha 7$ -5HT₃A que solo se necesita la ocupación de tres sitios de unión para la completa activación del receptor (Rayes y col., 2009); la ocupación del resto de sitios solo potenciaría la sensibilidad al agonista (Rayes y col., 2009). Los resultados obtenidos en estudios cinéticos sobre receptores 5HT₃A (Solt y col., 2007; Corradi y col., 2009) y en receptores de glicina (Beato y col., 2004; Lape y col., 2008), están en concordancia con las conclusiones obtenidas para los nAChRs homoméricos.

En relación con los agonistas nicotínicos disponibles actualmente (Tabla 2), la mayor parte se caracterizan por no poseer selectividad receptorial, es decir, son capaces de activar todos los subtipos de receptores nicotínicos. La aparición de nuevos compuestos selectivos permite conocer la implicación de un determinado subtipo de receptor en una determinada función fisiológica o fisiopatológica.

De todos los agonistas identificados, los más importantes y más utilizados rutinariamente como sondas de nAChRs neuronales son nicotina, citosina, anatoxina y el potente alcaloide epibatidina. A pesar de mostrar una limitada selectividad por subtipos de nAChRs, existen diferencias de rango en el orden de potencias para cada compuesto, que depende de la combinación específica de las subunidades del receptor y de la especie estudiada, como se describe a continuación.

La *nicotina* es un alcaloide aislado de la planta *Nicotiana tabacum*. Este agonista clásico es el más empleado para diferenciar los nAChRs de los receptores muscarínicos. La nicotina se une con gran afinidad a nAChR neuronales

heteroméricos y con menor afinidad a los nAChR musculares y neuronales homoméricos. El receptor $\alpha 4\beta 2$ parece mostrar la mayor sensibilidad hacia la nicotina (Flores y col., 1992)

TABLA 2. Ligandos de receptores nicotínicos neuronales

| Nombre Agonista | nAChR y/o tejido | Nombre Antagonista | nAChR y/o tejido |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|---|
| 5-I-A85380 | no selectivos | α -conotoxina MII | no selectivos |
| ABT-418/ABT-089 | no selectivos | Clorisondamina | no selectivos |
| Acetilcolina | no selectivos | Dihidro- β -eritroidina | no selectivos |
| Anabaseína | no selectivos | D-Tubocurarina | no selectivos |
| Anatoxina | no selectivos | Erisodina | no selectivos |
| Carbacol | no selectivos | Hexametonio | no selectivos |
| Dimetilfenilpiperazinio | no selectivos | Mecamilamina | no selectivos |
| Epibatidina | no selectivos | Trimetafán | no selectivos |
| Lobelina | no selectivos | α -bungarotoxina | selectivos nAChR homoméricos y muscular |
| Nicotina | no selectivos | n-bungarotoxina | no selectivos |
| 4-OH-GTS-21 | selectivos $\alpha 7$ | α -conotoxina Iml | selectivos $\alpha 7$ |
| AR-R17779 | selectivos $\alpha 7$ | Metilicacotinina | selectivos $\alpha 7$ |
| Colina | selectivos $\alpha 7$ | | |
| GTS-21 | selectivos $\alpha 7$ | | |
| PNU-282987 | selectivos $\alpha 7$ | | |

La *citisina* es un alcaloide tóxico aislado de *Cytisina laburnum*. La *citisina* es agonista para la mayoría de nAChR pero su afinidad por los receptores que contienen las subunidades $\alpha 4$ o $\beta 2$ (Luetje y col., 1991; Papke y col., 1994) es aproximadamente 100 veces más alta que para los nAChR neuronales homomérico o musculares

(Chavez-Noriega y col., 1997; Slater y col., 2003). En los receptores $\alpha 4\beta 2$ la citisina muestra una eficacia dependiente de la estequiometría, que puede ser potencialmente útil en el diseño de fármacos (Moroni y col., 2006).

La anatoxina-a es un alcaloide natural producido por la cianobacteria de agua dulce *Anabaena Flos-aquae*. En el nAChR muscular se ha visto que este compuesto es casi ocho veces más potente que la ACh (Swanson y col., 1986). Estudios con los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ han demostrado que la anatoxina-a es considerablemente más potente que la nicotina, con una mayor acción en el receptor $\alpha 4\beta 2$ que en el receptor $\alpha 7$ homomérico (Thomas y col., 1993).

La epibatidina es un alcaloide aislado de la piel de la rana ecuatoriana *Epipedobates tricolour* (Spande y col., 1992). La epibatidina es estructuralmente similar a la nicotina y a la ACh, y activa a todos los nAChRs con una potencia elevada, siendo máxima para el receptor $\alpha 4\beta 2$.

1.8.2.-Antagonistas competitivos de los nAChRs

Los antagonistas competitivos (Tabla 2) son compuestos que se unen al sitio de unión a ACh en el nAChR, pero no producen la activación del canal del receptor. En general, los antagonistas competitivos son compuestos más grandes que los agonistas y más propensos a interactuar con una mayor área de los receptores (Swanson y col., 1992). Al igual que para los agonistas alcaloides, los compuestos básicos de origen vegetal han demostrado ser también una fuente rica de antagonistas competitivos colinérgicos.

Obtenido a partir del arbusto *Chondrodendron tomentosum*, el antagonista competitivo clásico *d-tubocurarina* es uno de los componentes neurotóxicos del veneno que impregnan en las flechas los indígenas de América del Sur. Sus propiedades colinérgicas se identificaron hace casi 100 años (Chiappinelli, 1985). Este alcaloide se une inespecíficamente a todos los nAChRs con una sensibilidad similar en el rango bajo micromolar. Sin embargo, en el nAChR muscular muestra una afinidad diferencial para los dos sitios de unión al agonista: existe un sitio de alta afinidad en la interfase formada por la subunidades α y ϵ o γ , y un sitio de baja afinidad en la interfase entre las subunidades α y δ (Blount y col., 1989; Sine y col., 1991).

La MLA (*metillicaconitina*) se aísla de las semillas de *Delphinium brownie* y es capaz de bloquear de forma específica y con gran potencia al nAChR $\alpha 7$ en preparaciones de cerebro y membrana a concentraciones nanomolares bajas (Alkondon y col., 1992). Sin embargo, este alcaloide también bloquea los nAChRs $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 4\beta 2$, aunque a concentraciones superiores a 100 nM (Eaton y col., 2003).

La *dihidro- β -eritroidina* (Dh β E) es otro potente alcaloide que se une a nAChRs en el rango nanomolar. Aislado de las semillas de la especie de *Arthurian*, este compuesto bloquea tanto nAChRs heteroméricos como homoméricos, aunque parece ser un antagonista más eficiente para el subtipo $\alpha 4\beta 2$ (Decker y col., 1995).

La α -*Bungarotoxina*, aislada del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*, se ha utilizado ampliamente en la identificación y caracterización de nAChRs y en estudios de desplazamiento para definir nuevos compuestos nicotínicos. La α -Bgt se une a nAChRs del músculo esquelético y neuronales homoméricos con alta afinidad y especificidad; sin embargo, no bloquea ningún complejo heteromérico $\alpha\beta$ (Chiappinelli, 1985; McGehee y col., 1995). La *n-Bugarotoxina* (n-Bgt), también extraída del veneno de *Bungarus multicinctus*, es un potente bloqueador de muchos nAChRs heteroméricos. Bloquea a los receptores $\alpha 3\beta 2$ en el rango nanomolar y a los receptores $\alpha 4\beta 2$ en el rango micromolar. Sin embargo, las conformaciones del receptor que contienen la subunidad $\alpha 2$ parecen ser las más insensibles a este bloqueador (Luetje y col., 1990).

La α -*Conotoxina* (α -Ctx) son pequeños péptidos neurotóxicos procedentes del veneno de los caracoles *Conus geographicus*, *C. Magus*, *C. Imperialis* y otros. Se unen con alta afinidad al nAChR muscular, produciendo el bloqueo de la transmisión neuromuscular. Uno de estos péptidos, la α -Ctx MI se une selectivamente al sitio de unión de la interfase α - δ (Martínez y col., 1995; Jacobsen y col., 1999). La α -Ctx IMI bloquea reversiblemente al receptor $\alpha 7$ en el rango nanomolar, pero es incluso más potente en el receptor $\alpha 9$ (Johnson y col., 1995^a). Sin embargo, esta neurotoxina no tiene efecto sobre los subtipos del nAChR heteroméricos α/β . Por otro lado, la α -Ctx MII bloquea los receptores heteroméricos, mostrando mayor afinidad (rango nanomolar) para el subtipo $\alpha 3\beta 2$ y menos afinidad para el subtipo muscular (Cartier y col., 1996; Harvey y col., 1997; McIntosh y col., 1999).

1.8.3.-Moduladores alostéricos de los nAChRs

Además de los agonistas y antagonistas competitivos, que interactúan con el sitio de unión a ACh, la función de nAChRs puede ser modulada positiva o negativamente por sustancias que se unen a un sitio dentro de la estructura pentamérica del receptor independiente al sitio de unión del agonista. Hay una amplia variedad de compuestos que modulan la función de los nAChR. De hecho, muchas sustancias endógenas pueden regular la función de nAChR: por ejemplo, esteroides, que principalmente inhiben la función del receptor (Giniatullin y col., 1999; Paradiso y col., 2003); los

cationes divalentes, tales como Ca^{2+} y Zn^{2+} ; proteínas tales como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Buisson y col., 1998; Giniatullin y col., 1999) o lynx1, una proteína neuronal relacionada con α -neurotoxinas, descubierta en el cerebro de los mamíferos (Miwa y col., 1999) y que modula la función de los nAChR $\alpha 4\beta 2$ expresados en ovocitos cuando se aplica de forma externa (Ibanez-Tallon y col., 2002). Sin embargo, cuando se coexpresa con nAChRs o de forma endógena, inhibe la respuesta nicotínica de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ al potenciar la desensibilización (Ibanez-Tallon y col., 2002; Miwa y col., 2006). Estudios en ratones KO para el gen que codifica a lynx1, proponen un rol modulador directo sobre el nAChR, permitiendo la desensibilización para así limitar la excitabilidad celular que se daría en condiciones de estimulación nicotínica continua (Miwa y col., 2006).

Los moduladores alostéricos positivos (MAPs), inducen un cambio conformacional aumentando la probabilidad de apertura del canal inducida por ACh y otros agonistas nicotínicos. Cuando se aplican solos, tienden a comportarse generalmente de una manera agonista con poca eficacia a dosis bajas, y como bloqueadores de canal abierto a dosis altas, pero potencian la activación inducida por ACh u otros agonistas, lo que indica que los MAPs y las moléculas agonistas pueden unirse simultáneamente al receptor, interactuando en sitios diferentes.

La fisostigmina es un ejemplo bien conocido de MAP (Seerden y col., 1998). Se ha demostrado que el uso de fisostigmina tritiada marca el residuo Lys125 del dominio N-terminal de la subunidad $\alpha 1$ del nAChR de *Torpedo* (Albuquerque y col., 1996), que no se encuentra en la proximidad del sitio de unión del neurotransmisor. Otros ejemplos de MAPs incluyen al inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE), galantamina (Badio y col., 1997; Smulders y col., 2005), el alcaloide codeína (Che y col., 2001); el neurotransmisor serotonina a dosis bajas (Albuquerque y col., 1996); y el antihelmíntico ivermectina (Krause y col., 1998)). Más recientemente, se han descrito las propiedades activadoras del 17β -estradiol sobre el nAChR $\alpha 4\beta 2$ humano (Curtis y col., 2002). Para más información ver Tabla 3.

TABLA 3. Moduladores Alostéricos Positivos de nAChRs

| | Nombre | nAChR y/o tejido | Referencia |
|------------------|----------------------------------|--|---|
| Endógenos | Péptido derivado de AChE (PDChE) | Hipocampo (rata), $\alpha 7$ (humano) | (Greenfield y col., 2004; Zbarsky y col., 2004) |
| | Albúmina | Sinaptosomas (ratón), $\alpha 7$ (pollo) | (Butt y col., 2002; Conroy y col., 2003) |

| | | | |
|-----------------|-----------------------------------|---|---|
| | CGRP1-4/5/6 | Célula cromafín (rata) | (Di Angelantonio y col., 2003) |
| | Estradiol | $\alpha 4^*$ (humano) | (Curtis y col., 2002) |
| | Lynx1 (in Vitro) | $\alpha 4\beta 2$ (pollo) | Miwa y col., 1999 |
| | SLURP-1 | $\alpha 7$ (humano) | (Chimienti y col., 2003) |
| | Zinc (<100 μ M) | $\alpha 7^{L247T}$ (pollo), $\alpha 2^*$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4^*$ (rata), $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ | (Palma y col., 1998; Hsiao y col., 2001; Moroni y col., 2008) |
| Exógenos | 2-amino-cetotiazoles (LY-2087101) | $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 7$ (humano) | (Broad y col., 2006) |
| | Compuesto 6 | $\alpha 7$ (humano) | (Ng y col., 2007) |
| | Etanol | $\alpha 2^*$, $\alpha 3^*$, $\alpha 4^*$, órgano eléctrico de <i>Torpedo</i> | (Covernton y col., 1997) |
| | Fisostigmina | órgano eléctrico de <i>Torpedo</i> | (Maelicke y col., 1997) |
| | Galantamina | $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 4$ (humano) $\alpha 7/5$ -HT ₃ (pollo) | (Samochocki y col., 2003) |
| | Genisteína ¹ | $\alpha 7$ (humano) | (Gronlien y col., 2007) |
| | 5-HI | $\alpha 7$ (humano y rata) | (Zwart y col., 2002) |
| | Ivermectina | $\alpha 7$ (humano y pollo) | Krause y col., 1998 |
| | Levamisol | $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ (humano) | (Levandoski y col., 2003) |
| | Morantel | $\alpha 3\beta 2$ (rata), agonista $\alpha 7$ (humano) y $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ (ratón) | (Wu y col., 2008; Bartos y col., 2009) |
| | NS-1738 | $\alpha 7$ (humano) | (Timmermann y col., 2007) |
| | PNU120596 | $\alpha 7$ (humano y rata) | (Hurst y col., 2005) |
| | TQS | $\alpha 7$ (humano) | Gronlien y col., 2007 |

| | | | |
|--|------------|--|--------------------------|
| | Codeína | | Che y col., 2001 |
| | Serotonina | | Albuquerque y col., 1996 |

¹ También puede modular el receptor indirectamente por inhibición de kinasas (Akiyama y col., 1987)

Los moduladores negativos son llamados inhibidores no competitivos (INC) o bloqueadores de canal abierto (BCA), si sus efectos requieren que el canal del receptor esté abierto. Inhiben el flujo iónico activado por los agonistas sin afectar la unión del mismo, ya sea mediante el bloqueo del poro por mecanismos estéricos, o actuando alostéricamente en la conformación del canal.

Se sabe que muchas sustancias poseen, además de otras acciones farmacológicas, propiedades de bloqueo (Arias, 1998; Arias, 1999). Por ejemplo, las sustancias cargadas, tales como [(2,6-dimethylphenylcarbonyl)metil]-trimethylammonium, o el trifenilmetilfosfonio; compuestos básicos como los anestésicos locales clorpromazina o fenciclidina, sustancias lipofílicas como 3-(3-yodofenil)-3-trifluorometil- 3H-diazirine; e incluso compuestos ácidos como los barbitúricos (Arias y col., 2001), parecen interactuar con algunos residuos del segmento M2 del poro del canal, mientras que las sustancias del tipo de esteroides, ácidos grasos o quinacrina se unen a otros sitios de la proteína situados en dominios extracelulares (extremos N o C-terminales) o cerca de la membrana. Recientemente se describieron las propiedades bloqueadoras de la metadona y su metabolito R-(p)-2-etil-1,5-dimetil-3,3-difenil-1-pyrrolinium (EDDP) sobre el nAChR $\alpha 3\beta 4$ de rata expresado en células HEK-293 (Xiao y col., 2001), y para la clozapina sobre el receptor muscular de ratón (Nguyen y col., 2002).

Es importante tener en cuenta que muchas sustancias muestran un modo de acción dual, siendo bloqueadores competitivos/no-competitivos, o activadores/bloqueadores, dependiendo de la dosis empleada, el subtipo de receptor, o de la introducción de ciertas mutaciones en el poro del canal. Por ejemplo, la serotonina aplicada a una concentración subnanomolar se comporta como un MAP, a concentraciones micromolares inhibe la activación del canal de una forma voltaje-dependiente y en receptores $\alpha 7$ portadores de la mutación L248T, su acción cambia de inhibición no-competitiva a activación (Fucile y col., 2002). El antagonista del receptor de GABA_A bicuculina muestra un comportamiento similar, siendo un antagonista no-competitivo de receptores heteroméricos, un antagonista competitivo del receptor $\alpha 7$ silvestre, y un agonista del receptor $\alpha 7$ mutante L248T (Demuro y col., 2001).

Antagonistas de los receptores muscarínicos como atropina y escopolamina, y los inhibidores de la AChE fisostigmina, tacrina y galantamina, a concentraciones entre 1 y 100 mM, potencian la corriente iónica activada por bajas concentraciones de ACh en receptores $\alpha 4\beta 2$ humanos expresados en ovocitos. Sin embargo, a concentraciones saturantes de ACh el mismo rango de concentraciones de estos compuestos inhiben la función de los receptores (Smulders y col., 2005). (Hansen y col., 2007) realizaron una reflexión sobre el modo y el lugar de acción de esta clase de MAPs, y describieron como la galantamina y la cocaína se unen a sitios ubicados en interfases entre subunidades, de los que forman parte aminoácidos hidrofóbicos conservados. Este sitio se asemeja al sitio de unión de las benzodiazepinas del receptor GABA_A, en el sentido de que en ambos existen residuos que ocupan posiciones homólogas a los residuos que contribuyen al sitio de unión al agonista. Ver Tabla 4 para información adicional.

TABLA 4. Otros Moduladores Negativos de nAChRs

| | Nombre | nAChR y/o tejido | Referencia |
|------------------|-----------------------------------|--|---|
| Endógenos | β -amiloide ₁₋₄₂ | hipocampo (rata) | (Liu y col., 2001; Pettit y col., 2001) |
| | catestatina | célula cromafín (vaca) | (Mahata y col., 1997; Herrero y col., 2002) |
| | CGRP _{1-5/2-7} | célula cromafín (rata) | (Giniatullin y col., 1999; Di Angelantonio y col., 2003) |
| | Disnorfina A | PC12 | (Oka y col., 1998; Itoh y col., 2000) |
| | Disnorfina B | $\alpha 9/\alpha 10$ | (Lioudyno y col., 2002) |
| | Endomorfina-1 | $\alpha 9/\alpha 10$ | (Lioudyno y col., 2002) |
| | Glucocorticoides | $\alpha 3^*$, células SHSY5Y | (Ke y col., 1996) |
| | Lynx1 (in vivo, coexpresada) | $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ (ratón) | (Ibanez-Tallon y col., 2002; Miwa y col., 2006) |
| | Proadrenomedulina | PC12 | (Mahata y col., 1998) |
| | Serotonina (5-HT) | célula cromafín (vaca) | (Vijayaraghavan y col., 1993) |
| | sustancia P | célula cromafín (vaca, rata) | (Livett y col., 1979; Clapham y col., 1984; Di Angelantonio y col., 2003) |

| | | | |
|-----------------|-----------------------|---|--|
| | Timopentina | célula cromafín (vaca) | (Afar y col., 1993) |
| | Zinc (<100 μ M) | $\alpha 7$ (ratón), $\alpha 3\beta 2$ (rata), $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ | (Palma y col., 1998; Hsiao y col., 2001; Moroni y col., 2008) |
| Exógenos | Citalopram | Rodajas hipocampo (rata) | (Hennings y col., 1999) |
| | Clozapina | $\alpha 7$ (pollo) | (Singhal y col., 2007) |
| | Cocaína | Rodajas hipocampo (rata) | (Hennings y col., 1999; Francis y col., 2000; Francis y col., 2001) |
| | ω -Ctx-Aga IVA | célula cromafín (vaca) | (Granja y col., 1995) |
| | ω -Ctx-G VIA | célula cromafín (vaca) | (Fernandez y col., 1995) |
| | N-metilcocaína | $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ (humano) | Francis y col., 2001 |
| | Desipramina | célula cromafín (vaca) Rodajas hipocampo (rata) | (Izaguirre y col., 1997) |
| | Etanol | $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ (humano) | (Yu y col., 1996; Covernton y col., 1997; Cardoso y col., 1999) |
| | Fluoxetina | $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3^*$, $\alpha 7$ (humano) | (Garcia-Colunga y col., 1997; Maggi y col., 1998; Fryer y col., 1999) |
| | Nefazodona | $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$, $\alpha 3^*$ (humano) | (Fryer y col., 1999) |
| | Nifedipino | célula cromafín (vaca) células ImR32 | (Lopez y col., 1993; Donnelly-Roberts y col., 1995; Gandia y col., 1996) |
| | Nisoxetina | Rodajas hipocampo (rata) | (Kiss y col., 1997; Hennings y col., 1999) |
| | Nomifensina | Rodajas hipocampo (rata) | (Kiss y col., 1997; Hennings y col., 1999) |
| | Ondansetrón | $\alpha 7$ (rata), $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ (humano) | (Papke y col., 2004) |
| | Paroxetina | $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$, $\alpha 3^*$ (humano) | (Fryer y col., 1999) |
| | Sertralina | $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$, $\alpha 3^*$ (humano) | (Fryer y col., 1999) |

| | | | |
|--|-------------|---|--------------------------|
| | Tropisetron | $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ (humano) | Papke y col., 2004 |
| | Tramadol | célula cromafín (vaca), $\alpha 7$ (pollo) | (Shiraishi y col., 2002) |
| | Velafaxina | $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, $\alpha 3^*$ (humano) | (Fryer y col., 1999) |

1.9.-Fisiología

Las neuronas expresan gran diversidad de receptores nicotínicos neuronales, que junto a los receptores de tipo muscarínico, son capaces de elevar la $[Ca^{2+}]$ citosólica tras su activación con el agonista endógeno Ach. La localización subcelular de estos receptores, así como su sensibilidad al ligando y sus características cinéticas condicionan el incremento de la $[Ca^{2+}]$ citosólica y su posible función dentro de la célula (Dani, 2001; Dajas-Bailador y col., 2004). Sin embargo, queda mucho por conocer acerca de porqué la célula es capaz de expresar en su membrana de manera tan selectiva gran diversidad de receptores nicotínicos, y cual es la función de los mismos en la célula.

Los receptores nicotínicos de acetilcolina están involucrados en diversas funciones como son la función cognitiva, el desarrollo neuronal, degeneración, el aprendizaje y la memoria, locomoción, ansiedad, nocicepción, neurotransmisión dopaminérgica, función autonómica, adicción y desarrollo del sistema sensorial, nombrando unas pocas (Jones y col., 1999; Vizi y col., 1999; Cordero-Erausquin y col., 2000; Drago y col., 2003). Generalmente estos efectos se atribuyen a la existencia de receptores nicotínicos en la terminal pre o perisináptica, que se creen estar compuestos por las subunidades $\alpha 7$ (Wonnacott, 1997), $\alpha 4$ y $\beta 2$. La activación de estos receptores produce un flujo de iones Na^+ y Ca^{2+} hacia el interior celular que provoca, por sí mismo o a través de canales de calcio activados por voltaje (CCDV), la modulación de la secreción dependiente de Ca^{2+} de varios neurotransmisores tales como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato y GABA (McGehee y col., 1995; Soliakov y col., 1995; Clarke y col., 1996; Dani, 2001; Dajas-Bailador y col., 2004).

Sin embargo, no hay que olvidar el papel de estos receptores a un nivel postsináptico en el control de la transmisión en ganglios periféricos, hipocampo y corteza sensorial (Jones y col., 1999). Aunque han sido bastante difícil de localizar, la presencia postsináptica de los subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ se ha demostrado en varias regiones del cerebro (Levy y col., 2002; Sher y col., 2004). En particular, se ha observado como la excitación nicotínica postsináptica puede mejorar la potenciación sináptica en el

hipocampo (Ji y col., 2001); su presencia en interneuronas del hipocampo hace que también medien en la transmisión sináptica rápida (Alkondon y col., 1998; Frazier y col., 1998^a); y se ha postulado su implicación en la potenciación a largo plazo (LTP), base de los cambios plásticos asociados al aprendizaje y la memoria (Matsuyama y col., 2003).

Junto a estas funciones en el individuo adulto se ha descrito la existencia de transcripción de diversas subunidades del receptor nicotínico a lo largo del desarrollo embrionario, lo que le confiere un papel más o menos influyente en la diferenciación, proliferación y determinación celular.

Una implicación que a lo largo de los últimos años ha ido adquiriendo más adeptos es la acción neuroprotectora ejercida por estos receptores mediada por el receptor $\alpha 7$, al inducir la síntesis de factores de crecimiento nervioso o reducir la citotoxicidad mediada por glutamato (Shimohama y col., 1996; Kaneko y col., 1997).

En los últimos años se han desarrollado ratones con ablación en genes que codifican para alguna de las subunidades descritas del receptor nicotínico neuronal, demostrando la importancia funcional de estos receptores en el individuo adulto. Si bien algunos de estos ratones no presentan cambios apreciables, en la mayor parte de los casos se producen alteraciones que conllevan a la inviabilidad del individuo (Cordero-Erausquin y col., 2000; Champtiaux y col., 2004; Jensen y col., 2005; Fowler y col., 2008). Por ejemplo, ratones con la ablación conjunta de las subunidades $\beta 2$ y $\beta 4$ o de la subunidad $\alpha 3$ han resultado ser inviables. Sin embargo, la ablación de otros genes no es esencial para la vida, pero sí para el desarrollo normal de algunas funciones. De esta forma se ha demostrado la implicación de la subunidad $\beta 2$ en procesos de aprendizaje y en el desarrollo del sistema visual (Rossi y col., 2001), a la subunidad $\alpha 4$ en los procesos de analgesia mediada por nicotina o a la subunidad $\beta 3$ en la formación de receptores sensibles a α -conotoxina MVII. Curiosamente, hasta el momento no se ha detectado ningún trastorno en el desarrollo en ratones carentes de la subunidad $\alpha 7$. Sin embargo, la inclusión la mutación L250T, que produce receptores $\alpha 7$ más sensibles a Ach y que no se desensibilizan, genera animales con apoptosis extensa en la corteza somato-sensorial, que no suelen sobrevivir más de un día (Cordero-Erausquin y col., 2000).

Por otra parte, la implicación de los nAChRs en las funciones del sistema nervioso mencionadas en párrafos anteriores, ha permitido relacionar a los nAChRs con un gran número de patologías del sistema nervioso: enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Clementi y col., 2000; Court y col., 2000; Wu y col., 2004) o la enfermedad de Parkinson (Quik y col., 2002; Champtiaux y col., 2003),

disfunciones cerebrales como el síndrome de Tourette (Gotti y *col.*, 2004), el autismo (Lee y *col.*, 2002; Granon y *col.*, 2003; Martin-Ruiz y *col.*, 2004), epilepsias como la hereditaria de tipo ADNFE (epilepsia frontal nocturna autosómica dominante) (Combi y *col.*, 2004), esquizofrenia (Court y *col.*, 2000; Martin-Ruiz y *col.*, 2003) o el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (Pomerleau y *col.*, 1995; Blondel y *col.*, 2000; Grottick y *col.*, 2000), e incluso en procesos de ansiedad y depresión (Picciotto y *col.*, 2002; Shytle y *col.*, 2002^a; Shytle y *col.*, 2002b) o analgesia (Vincler, 2005).

Los nAChRs también se han involucrado en procesos de dependencia a la nicotina o a otras drogas. En este caso la diana de acción son los receptores presinápticos $\alpha 4\beta 2$ que modulan la neurotransmisión de dopamina en el sistema mesolímbico (Picciotto y *col.*, 1998; Marubio y *col.*, 2003; Tapper y *col.*, 2004).

Las funciones fisiológicas de los nAChRs en tejidos no-neuronales aún están por esclarecer. Hasta el momento se les ha relacionado con la proliferación celular, probablemente por la activación de las quinasas MAP y Akt vía Ca^{2+} (Wada y *col.*, 1989; Schuller y *col.*, 2000; West y *col.*, 2003), con el control de la presión sanguínea (Wada y *col.*, 1989; Clarke, 1993) o con inflamación, ya que la activación de receptores $\alpha 7$ en macrófagos provoca la inhibición de la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de 45itonas proinflamatorias (Wang y *col.*, 2003). Así, los nAChRs se han visto implicados en la patología de ciertas enfermedades, como el crecimiento de tumores, patologías pulmonares, reacciones inflamatorias o inmunológicas, o hipertensión, entre otras, lo que los convierte en potenciales dianas terapéuticas.

Mención aparte merecen las enfermedades autoinmunes en las que están implicados los nAChRs. Así, la miastenia gravis es una enfermedad autoinmune, en la que las defensas del organismo producen anticuerpos frente a los nAChRs presentes en las membranas postsinápticas de las placas neuromusculares provocando la enfermedad, caracterizada por debilidad y fatiga de la musculatura voluntaria (Thanvi y *col.*, 2004). La gangliopatía autonómica autoinmune es un trastorno neurológico adquirido que se caracteriza por un fallo autonómico difuso, que parece deberse a la generación de anticuerpos dirigidos hacia el receptor nicotínico ganglionar (Vernino y *col.*, 2000), en especial contra la subunidad $\alpha 3$ (Vernino y *col.*, 2009).

1.10.-Los receptores nicotínicos de la célula cromafín bovina

En la médula adrenal, el nervio esplácnico libera acetilcolina que activa los nAChRs neuronales presentes en la membrana de la célula cromafín, lo cual induce la

despolarización de la membrana que desencadena la liberación de catecolaminas al torrente sanguíneo (Fenwick y col., 1982; Kidokoro y col., 1982) en preparación del cuerpo para las reacciones de lucha y huida. La célula cromafín constituye un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la farmacología colinérgica y de la neurosecreción desde hace 50 años (Douglas y col., 1967; Douglas, 1968).

Uno de los modelos experimentales más utilizados en nuestro laboratorio es el de la célula cromafín bovina (CCB). Wilson y Kirshner fueron los primeros en describir la presencia de sitios de unión para α Bgt en CCB (Wilson y col., 1977). Casi dos décadas después, fue clonada la subunidad $\alpha 7$ del nAChR bovino y la inyección de su ARNm en ovocitos de *Xenopus laevis* produjo sitios de unión para α Bgt y corrientes nicotínicas que eran bloqueadas por esta toxina (Garcia-Guzman y col., 1995). Más tarde también se caracterizaron y clonaron las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$ del nAChR de la CCB (Criado y col., 1992; Campos-Caro y col., 1997; Wenger y col., 1997), que formaban receptores nicotínicos funcionales $\alpha 3\beta 4$ al expresarse heterológamente en ovocitos de *Xenopus* (Campos-Caro y col., 1997).

Por todo ello se supuso la existencia de dos subtipos de nAChRs en CCB, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, ambos presuntamente implicados en el control de la secreción de catecolaminas. Sin embargo, los intentos por bloquear con α Bgt la secreción de catecolaminas inducida por diferentes agonistas del nAChR produjeron resultados negativos (Wilson y col., 1977; Kumakura y col., 1980; Trifaro y col., 1980; Kilpatrick y col., 1981) o datos conflictivos (Kageyama y col., 1984), lo que llevó a pensar que el proceso secretor era iniciado exclusivamente por los nAChRs no sensibles a α Bgt, es decir, por los $\alpha 3\beta 4$.

Posteriormente, usando nuevos protocolos (pulsos cortos de ACh para prevenir la desensibilización del nAChR $\alpha 7$) y nuevas herramientas farmacológicas (bloqueadores selectivos del subtipo de receptor nicotínico $\alpha 7$) como α -conotoxina Iml (McIntosh y col., 1994; Johnson y col., 1995b) y metilcaconitina (MLA) (Ward y col., 1990), López y colaboradores obtuvieron en 1998 (Lopez y col., 1998) datos que sugerían que ambos receptores nicotínicos, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, contribuían tanto a la generación de corrientes nicotínicas, como al desencadenamiento de la entrada de Ca^{2+} y posterior liberación de catecolaminas en respuesta a la estimulación de las CCB con ACh (López y col., 1998).

A pesar de que existen datos, tanto en la literatura (Criado y col., 1997; El-Hajj y col., 2007), como en nuestro propio grupo de investigación (Maneu y col., 2002); otros datos no publicados del grupo) de la presencia de receptores $\alpha 7$ en la membrana celular de la célula cromafín bovina, todavía no ha sido posible demostrar de forma

directa su posible papel funcional. Datos recientemente publicados (Criado y col.) demuestran que la subunidad $\alpha 7$ interacciona con la subunidad $\beta 4$ en la célula cromafín, formando receptores heteroméricos funcionales cuando se coinyectan en ovocitos de *Xenopus*. De esta manera se puede explicar en parte la dificultad en asignar una clara influencia de los nAChRs $\alpha 7$ sobre la secreción de catecolaminas (Trifaro y col., 1980; Kageyama y col., 1984; Fuentealba y col., 2004), función completamente atribuida a los receptores $\alpha 3\beta 4^*$. Por otro lado, la asociación de la subunidad $\alpha 7$ con otras subunidades del nAChRs podría justificar la detección de respuestas $\alpha 7$ no convencionales no solo en la célula cromafín (Lopez y col., 1998), sino también en otros sistemas celulares (Cuevas y col., 1998; Yu y col., 1998b).

La posibilidad de la existencia de receptores heteroméricos $\alpha 7$ unido a la reciente publicación de trabajos acerca del receptor $\alpha 3\beta 4$ que demuestran que éste puede existir en dos estequiometrías alternativas, con dos o tres copias para la subunidad $\alpha 3$ en el canal pentamérico (Krashia y col., 2010) y que, por otra parte, podrían explicar las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos en los sistemas de expresión heteróloga y en la célula cromafín bovina, abren un amplio abanico de posibilidades en cuanto a la composición de subunidades del nAChRs presente en la CCB, cuya estequiometría está aún por resolver.

2.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación viene trabajando desde hace años en la identificación y caracterización de la estructura y función secretora del receptor nicotínico de la célula cromafín bovina, desde el punto de vista electrofisiológico, farmacológico y funcional.

Una de las inquietudes del grupo es conocer la composición de subunidades del receptor nicotínico, así como la estequiometría del mismo en este modelo celular que viene siendo utilizado de manera rutinaria. Como ya se ha comentado anteriormente, la célula cromafín bovina posee ARNm codificante para las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ (Criado *et al.*, 1992; García-Guzmán *et al.*, 1995; Campos-Caro *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1997), aunque no se ha demostrado aún si todas estas subunidades se asocian para dar lugar a un receptor complejo $\alpha 3\beta 4\alpha 5\alpha 7$ o si pueden existir diferentes combinaciones de estas subunidades para formar distintas subpoblaciones de receptores en la membrana de la célula cromafín bovina, como pueden ser receptores de subtipo $\alpha 7$ y receptores de subtipo $\alpha 3\beta 4\alpha 5$. A pesar de que existen datos, tanto en la literatura (Criado *et al.*, 1997; El-Hajj *et al.*, 2007), como en nuestro propio grupo de investigación de la presencia de receptores $\alpha 7$ en la membrana celular de la célula cromafín bovina, todavía no ha sido posible demostrar de forma directa su posible papel funcional. Las evidencias farmacológicas que el grupo ha aportado a lo largo de los últimos años no evidencian la existencia de un receptor homomérico $\alpha 7$ (Maneu y *col.*, 2002)(Joni y *col.*, 2007 y Elena y *col.*, 2009).

Así, el objetivo general de esta tesis es *caracterizar desde el punto de vista electrofisiológico, farmacológico, cinético, molecular y funcional los posibles subtipos de receptores nicotínicos presentes en la membrana de la célula cromafín bovina, mediante su expresión heteróloga en ovocitos de Xenopus laevis.*

Para ello, nos hemos servido de la oxotremorina-M como herramienta farmacológica y se ha caracterizado sobre distintos subtipos de nAChRs en un intento de encontrar un agonista capaz de discriminar entre los receptores $\alpha 7$ homoméricos y receptores $\alpha 3\beta 4$ heteroméricos, debido a que hasta la fecha no se han descrito agonistas selectivos para este último subtipo. La oxo-M se ha descrito como un potente agonista muscarínico (Cho y *col.*, 1962; Lin y *col.*, 1991), aunque se ha descrito su acción nicotínica en múltiples sistemas (Smith, 1982; (Hagglad y *col.*, 1985; Hong y *col.*, 1990); (Xian y *col.*, 1994); (Reitstetter y *col.*, 1994); (Akk y *col.*, 1999).

Por otro lado, basándonos en la existencia de dos estequiometrias alternativas para el receptor $\alpha 4\beta 2$, descrito por primera vez por Nelson y *col.*, 2003, hemos explorado esta

posibilidad en relación al receptor $\alpha 3\beta 4$, lo que podría explicar el motivo de las diferencias entre los resultados obtenidos en los sistemas de expresión heteróloga y en la célula cromafín bovina. Teniendo en cuenta trabajos previos sobre otros miembros de la familia de receptores nicotínicos, hemos utilizado la inyección de proporciones extremas de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ para la expresión de receptores con dos o tres subunidades α . Además, se han utilizado diversas herramientas farmacológicas como agonistas (ACh y oxo-M) y moduladores (zinc) para discriminar entre las dos formas del receptor, junto con técnicas electrofisiológicas (registros de fijación de doble electrodo y registros de canal único) para realizar la caracterización de ambos receptores.

Basándonos en los resultados obtenidos de la caracterización de los receptores expresados en nuestro sistema de expresión heteróloga, hemos utilizado las herramientas farmacológicas oxo-M y zinc para caracterizar la estequiometría de los nAChRs nativos presentes en la célula cromafín bovina, mediante el uso de la técnica electrofisiológica de *patch-clamp*

Una vez demostrada la existencia de las dos estequiometrias alternativas del receptor $\alpha 3\beta 4$ se hace evidente la importancia de trabajar con receptores con una composición de subunidades bien definida. Por este motivo, se crearon y caracterizaron receptores con subunidades concatenadas, ordenadas de una forma predeterminada, utilizando técnicas de biología molecular.

Esta tesis no solo contribuye a una mejor comprensión sobre las propiedades del receptor $\alpha 3\beta 4$ y del posible receptor presente en la célula cromafín bovina, sino también a un mayor entendimiento de la función del receptor $\alpha 3\beta 4$, mostrando el camino para futuros trabajos tales como:

- a) desarrollo de moléculas selectivas a una estequiometría concreta.
- b) comprensión del papel modulador ejercido por el Zn^{2+} sobre los nAChRs en las terminales presinápticas.
- c) ¿los cambios estequiométricos participan en el mecanismo celular de la comunicación neuronal o son solo artefactos de los sistemas heterólogos?

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.-Biología Molecular

La ligación de las moléculas de ADN, el mantenimiento y el crecimiento de bacterias de *Eschericia coli* DH5 α y el uso de enzimas de restricción se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Maniatis y col., 1989. Para la síntesis del ARN mensajero (ARNm) bovino, el Dr. Manuel Criado (Depto. De Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Miguel Hernández de Alicante), nos proporcionó amablemente los ADNc copia (ADNc) que codifican para los genes de las subunidades del nAChR bovino $\alpha 7$, $\alpha 3$, y $\beta 4$, incluídos en los vectores pSP64T (subunidades $\alpha 7$ y $\beta 4$) y en el vector “casero” p642 ($\alpha 3$). Por otro lado, para la síntesis del ARNm humano, el Dr. Jon Lindstrom (Medical School of the University of Pennsylvania, Philadelphia) y el Dr. Manuel Criado, nos proporcionaron los ADNc que codifican para los genes de las subunidades del nAChRs humano $\alpha 7$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$, incluídos en los vectores pSP64T (subunidades $\alpha 7$ y $\beta 4$), pSP64 poli A (subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$) y un vector “casero”, el p642 ($\alpha 3$). Por último, los ADNc de las subunidades nAChR humanas $\alpha 3$ y $\beta 4$ que se utilizaron para la construcción de los concatémeros fueron suministradas por el Dr. Jon Lindstrom a la Profesora Lucia Sivilotti (University College London, Londres, Reino Unido), que nos cedió a su vez tras su clonación en el vector pSP64 (Promega). La secuencia completa de los ADNc subclonados se verificó mediante secuenciación de ADN (DNA Sequencing Service, Cancer Institute and Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London, Londres, Reino Unido). Todos los vectores utilizados proporcionan resistencia a ampicilina. Las bacterias competentes se transformaron por choque térmico con estos vectores, de tal manera que se seleccionaron aquellas que contenían el vector, haciéndolas crecer en un medio con el antibiótico de selección. Para el aislamiento de los plásmidos y la purificación de ADN en geles de agarosa se utilizaron kits comerciales (Qiagen, España y Reino Unido).

3.1.1.-CONSTRUCCIÓN DE CONCATÉMEROS: ESTRATEGIA

La estrategia a seguir fue la construcción de trímeros y dímeros por separado, con ambos sitios de unión a acetilcolina (AChBS) libres. Por homología, usamos como modelo el procedimiento utilizado para la construcción pentamérica del nAChR ($\alpha 3$)₂($\beta 4$)₃ (Groot-Kormelink y col., 2006). Así, el orden de las subunidades para los concatémeros del receptor ($\alpha 3$)₂($\beta 4$)₃ fue el siguiente: β - β - α + β - α . En cambio, para el receptor ($\alpha 3$)₃($\beta 4$)₂ el orden de subunidades que se adoptó fue uno de los sugeridos

por (Carbone y col., 2009) para el receptor $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$: β - α - α + β - α . . Como podemos observar, esta estrategia y este orden de subunidades nos permite utilizar el mismo dímero para construir las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$, lo que redujo sustancialmente los pasos de ligación-restricción.

Para la unión de las distintas subunidades en cada construcción se utilizaron elementos enlazadores cortos de unos 23 a 25 aminoácidos, conteniendo repeticiones glutamina-alanina-prolina (QAP) más el extremo C-terminal de cada subunidad así como los aminoácidos necesarios para la creación de un sitio de restricción específico en cada unión de subunidades (ver **tabla 5**). Estos elementos enlazadores se diseñaron basándonos en los trabajos publicados por el grupo de Erwin Sigel sobre la concatenación de las subunidades del receptor GABA_A (Baumann y col., 2001; Baumann y col., 2002; Baumann y col., 2003). En todos los casos se eliminó el péptido señal excepto en los casos de las subunidades $\beta 4$ en la posición 1 de los trímeros y de dímeros. En la **tabla 5** se muestra un resumen de la secuencia de aminoácidos que conectan los extremos N-terminal y C-terminal de las subunidades adyacentes en cada trímero y en el dímero.

TABLA 5. Aminoácidos que conectan los extremos C- y N-terminal de subunidades adyacentes.

| Subunidades | Sitios de concatenación de las subunidades | Longitud del elemento enlazador (extremo <i>C-terminal</i> + (Q _x A _x P _x) + amino ácidos añadidos formando el sitio de restricción= total) |
|---|--|---|
| $\beta 4^{(1^o)}_{-}\beta 4^{(2^o)}$ Trímero β - β - α | <u>LFQTHAASEGPYAAQRDQQEFAP</u> | <u>17</u> +4+2=23 |
| $\beta 4^{(2^o)}_{-}\alpha 3^{(3^a)}$ Trímero β - β - α | <u>LFQTHAASEGPYAAQRDQQGTAP</u> | <u>17</u> +4+2=23 |
| $\beta 4^{(1^o)}_{-}\alpha 3^{(2^a)}$ Trímero β - α - α | <u>LFQTHAASEGPYAAQRDQQEFAP</u> | <u>17</u> +4+2=23 |
| $\alpha 3^{(2^a)}_{-}\alpha 3^{(3^a)}$ Trímero β - α - α | <u>PLMAREDAQQQQAAAPAQQGTAP</u> | <u>8</u> +13+2=25 |
| $\beta 4^{(1^o)}_{-}\alpha 3^{(2^a)}$ Dímero β - α | <u>LFQTHAASEGPYAAQRDQQGTAP</u> | <u>17</u> +4+2=23 |

Modificación del plásmido de expresión para albergar las construcciones concatémicas.

Se escogió el vector de expresión pCI (Promega, Reino Unido) para la clonación de las subunidades aisladas tras la adición de los elementos enlazadores y de los sitios de restricción, y también para las subunidades concatenadas de los trímeros y del dímero. La elección se hizo en base a que es un vector de expresión, por lo que se puede usar tanto para transcripción *in vitro* de ARNm como para su inyección nuclear en ovocitos de *Xenopus* o para la transfección de líneas celulares de mamífero como son las células HEK 293, en caso de que en un futuro se quiera estudiar la expresión de estas construcciones en otro sistema de expresión heteróloga.

El sitio de clonación múltiple (SCM) de este vector se modificó para albergar los sitios de restricción escogidos para flanquear a cada subunidad en las distintas construcciones concatémicas. Para ambos trímeros, las subunidades fueron subclonadas entre los siguientes sitios de restricción, teniendo en cuenta la posición que ocuparán en el concatémico independientemente de si son subunidades $\alpha 3$ o $\beta 4$:

Primera subunidad de los trímeros ($\beta 4_ \beta 4_ \alpha 3$ ó $\beta 4_ \alpha 3_ \alpha 3$): **NheI/EcoRI**

Segunda subunidad de los trímeros ($\beta 4_ \beta 4_ \alpha 3$ ó $\beta 4_ \alpha 3_ \alpha 3$): **EcoRI/KpnI**

Tercera subunidad de los trímeros ($\beta 4_ \beta 4_ \alpha 3$ ó $\beta 4_ \alpha 3_ \alpha 3$) **KpnI/XhoI**

Y las subunidades del dímero fueron subclonadas entre los sitios de restricción que se muestran a continuación:

Primera subunidad del dímero ($\beta 4_ \alpha 3$): **NheI/KpnI**

Segunda subunidad del dímero ($\beta 4_ \alpha 3$): **KpnI/NotI**

Así, los oligonucleótidos que se utilizaron para modificar el vector pCI fueron:

Oligo directo 5'-3':

NheI AscI EcoRI XbaI BglII KpnI PmeI XhoI BsiWI MluI EcoRV NotI
CTAGC GCGCGGCC GAATTC TCTAGA AGATCT GGTACC GTTTAAAC CTCGAG CGTACG ACGCGT GATATC GCGGCCGC

Oligo antisentido 5'-3':

NotI EcoRV MluI BsiWI XhoI PmeI KpnI BglII XbaI EcoRI AscI NheI
GCGGCCGC GATATC ACGCGT CGTACG CTCGAG GTTTAAAC GGTACC AGATCT TCTAGA GAATTC GCGCGGCC GCTAG

Para la inclusión de estos oligonucleótidos en el vector pCI, se hibridaron previamente a la reacción de ligación con el vector. La hibridación de los oligonucleótidos se realizó de la siguiente manera:

1. Los oligonucleótidos recién adquiridos se diluyeron en H₂O a una concentración final de 1 µg/µl
2. Mezcla de reactivos para un volumen final de reacción de 100 µl:

Tris-HCl 1 M a pH8, 5 µl

MgCl₂ 1 M, 1 µl

Oligo directo 200 mM (25 µl de la dilución stock de 1 µg/µl)

Oligo inverso 200 mM (25 µl de la dilución stock de 1 µg/µl)

1 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO)

H₂O (Completar hasta volumen final de 100 µl)

3. La mezcla de reacción se colocó en un baño a 95 °C durante 5 minutos; a continuación, se dejó enfriar lentamente durante toda la noche hasta alcanzar la temperatura ambiente.
4. La mezcla de reacción se precipitó con acetato de sodio y etanol y la doble cadena de ADN resultante se resuspendió hasta un volumen final de 1 µg/µl.

Tras la hibridación, la doble cadena de ADN correspondiente al nuevo SCM se ligó mediante el procedimiento estándar al vector pCI entre los sitios de restricción NheI y NotI (primer y último sitio de restricción del SCM original), habiendo sido digerido previamente éste por las enzimas mencionadas. Téngase en cuenta que los oligonucleótidos diseñados para la creación del nuevo SCM se sintetizaron para tener extremos 3' y 5' cohesivos, por lo que no requirieron de la digestión previa a la ligación por las enzimas NheI y NotI.

El vector pCI modificado se volvió a modificar para contener un único sitio de restricción Swal (cadena debajo de la región SV40) para la linealización del ADNc (ver Fig. 15), que es necesaria realizar para la transcripción *in vitro* de ARNm. El sitio de restricción se introdujo usando el kit QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Reino Unido). Los oligonucleótidos cebadores para la reacción de PCR se compraron de MWG (Reino Unido). La secuencia completa de los ADNc para el vector pCI silvestre y mutado se verificó mediante secuenciación de ADN (DNA Sequencing Service, Cancer Institute and Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London, Londres, Reino Unido). Con el objetivo de incrementar el

número de transformantes positivos, se modificó ligeramente el protocolo sugerido por el proveedor, tal y como se describe a continuación.

1. Se sintetizaron oligonucleótidos cebadores de 49 bases de longitud, y temperatura de fusión superior a 80 °C, portando la mutación deseada en la mitad de la secuencia.
2. Los cebadores se diluyeron hasta una concentración final de 150 ng/ μ l para ser usados en la reacción de PCR que introducirá la mutación.
3. La mezcla de reactivos para la reacción de PCR fue la siguiente:

5 μ l del tampón de reacción 10X

150 ng de plásmido pCI

3 μ l del cebador con sentido (450 ng)

3 μ l del cebador anti-sentido (450 ng)

3 μ l de DMSO

3 μ l de dNTPs (de una dilución stock de 10 mM)

1 μ l de enzima Pfu (2,5 U/ μ l del stock)

4. Las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguientes:

| Segmento | Números de Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|----------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 | 1 | 95 | 1 |
| 2 | 15 | 95 | 0,5 |
| | | 55 | 1 |
| | | 68 | 15 |

5. Tras la reacción de PCR, se añadió 1 μ l de enzima DpnI a la mezcla de PCR para degradar el ADN molde metilado (ADN no mutado), y dejar intacto solo el ADN de nueva formación (no-metilado y conteniendo la mutación deseada).
6. Se transformaron bacterias *E. Coli DH5 α* competentes con 20 μ l del producto de ligación. Tras incubarlas durante toda la noche a 37 °C, se

seleccionaron 3 colonias y se crecieron en 15 ml de medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se aisló el ADN plasmídico de las bacterias mediante miniprep con un kit comercial para purificación de ADN (Qiagen). El ADN plasmídico purificado se secuenció en su totalidad para confirmar la presencia de la mutación deseada y descartar la presencia de otras posibles mutaciones. Al vector resultante modificado le llamaremos a partir de ahora pSUNA.

| 1370 | 1380 | 1383-1390 | 1390 | 1400 |
|---|-----------------|----------------------------|------------------|------|
| 5'...GATAAGGATCCGGGCTGGCG | TAATAGCG | AAGAGGCCCGCACCGATCGCC...3' | silvestre | |
| 5'...GATAAGGATCCGGGCTGGCG | ATTTAAAT | AAGAGGCCCGCACCGATCGCC...3' | Swal | |
| Oligo directo 5' a 3': GATAAGGATCCGGGCTGGCGATTTAAATAAGAGGCCCGCACCGATCGCC | | | | |
| Oligo antisentido 5' a 3': GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTATTTAAATCGCCAGCCCGGATCCTTATC | | | | |
| Temperatura de fusión = 82'6 °C | | | | |
| Bases = 49 | | | | |
| Contenido en bases GC = 58.8% | | | | |
| Bases desapareadas = 6 | | | | |

Fig. 15. Secuencias silvestre y mutada del vector pSUNA (vector PCI modificado). Las bases silvestres y mutadas se muestran en negrita. Los oligos usados para la introducción del sitio de restricción Swal y sus características se muestran en la figura.

Adición de los enlazadores a las subunidades monoméricas y subclonación de las mismas en el vector pCI modificado.

Basándonos en los enlazadores diseñados con los sitios de restricción seleccionados (ver **Tabla 5**) se sintetizaron los cebadores adecuados para la inclusión de dichos enlazadores en cada subunidad mediante PCR (MWG, Reino Unido) (ver **Tabla 6**). A la primera subunidad $\beta 4$ del dímero y del trímero se les introdujo la secuencia Kozak (GCCACC) en una posición inmediatamente anterior al péptido señal y a todas las subunidades se les eliminó el codón de fin de mensaje en este paso de PCR, excepto a las subunidades $\alpha 3$ finales del trímero y del dímero. La adición de la secuencia Kozak y la eliminación de los codones de fin de mensaje se tuvieron en cuenta a la hora del diseño de los cebadores. Dado el bajo número de aminoácidos a incluir en los extremos 3' y 5' de cada subunidad para la formación de cada enlazador, la adición del mismo se realizó en un único paso de PCR, excepto para la segunda subunidad $\alpha 3$ del trímero β - α - α que debido a su corto dominio C-terminal precisa de la adición de más aminoácidos para la formación de un enlazador de longitud apropiada (ver **Tabla 5**).

En este caso, se realizaron dos pasos de PCR consecutivos para la adición secuencial del elemento enlazador en el extremo 3' de la subunidad. Así, durante el primer paso de PCR se eliminó del extremo 5' de la subunidad el péptido señal y se añadió la secuencia **GAATTC**GCACCT, que codifica para el sitio de restricción EcoRI (negrita) y para los aminoácidos alanina y prolina (resto de bases). En el extremo 3' de la subunidad se añadió la secuencia Q₄A₃ y se eliminó el codón de fin de mensaje. Durante el segundo paso de PCR se añadió en el extremo 3' la secuencia de aminoácidos PAQ₂ a continuación de la secuencia Q₄A₃ previamente incorporada y la secuencia para el sitio de restricción KpnI.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo de la forma que se explica a continuación:

1. Los cebadores (de 40 a 47 bases de longitud) se sintetizaron de forma que aparearan con 22 a 30 bases de la región codificante de la subunidad $\alpha 3$ o $\beta 4$, según correspondiese. La temperatura de fusión de estos cebadores estuvo comprendida entre 63 y 64 °C.
2. Los cebadores se diluyeron hasta una concentración final de 10 μ M para ser usados en la reacción de PCR correspondiente.
3. La mezcla de reacción de PCR fue la siguiente:

5 μ l del tampón de reacción 10X (Thermo Pol Buffer II)

150 ng de ADN plasmídico $\alpha 3$ o $\beta 4$ (*)

1 μ l del cebador directo (10 μ M)

1 μ l del cebador anti-sentido (10 μ M)

0,5 μ l de MgSO₄ (100 mM)

1 μ l de dNTPs (de una dilución stock de 10 mM)

1 μ l de enzima Vent polimerasa (2000 U/ml)

Completar con H₂O hasta 50 μ l de volumen final

(*) Para el segundo paso de PCR en el caso de la subunidad $\alpha 3$ en segunda posición del trímero β - α - α , se usó como molde 6 μ l del producto del primer paso de PCR.

TABLA 6. Diseño de oligos-cebadores para la inclusión de los enlazadores mediante PCR.

| $\beta 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ NheI/EcoRI/ KpnI/XhoI | Oligo directo (1 ^{er} paso de PCR) | | Oligo inverso (1 ^{er} paso de PCR) | |
|---|--|---|--|--|
| 1 ^a $\beta 4$ | NheI Kozac CTTGAAGCTAGCgccaccATGAGGCGCGCGCCTTCCTGGT | | CTTGAAGAATTCCTGTTGGTCACGCTGGGCAGCGTAGGGC | |
| 2 ^a $\beta 4$ | CTTGAAGAATTCGCACCTCGCGTGGCCAATGCGGAGGAAAAGC | | CTTGAAGGTACCCTGTTG GTCACGCTGGGCAGCGTAGGGC | |
| 3 ^a $\alpha 3$ | CTTGAAGGTACCGCACCTTCAGAGGCTGAGCACCGTCTATTTGA GCG | | CTTGAAGTCTGAGTTATGCATCTTCCTGGCCATCAGGGGTTG | |
| $\beta 4$ - $\alpha 3$ NheI/KpnI/N otI | Oligo directo (1 ^{er} paso de PCR) | | Oligo inverso (1 ^{er} paso de PCR) | |
| 4 ^a $\beta 4$ | NheI Kozac CTTGAAGCTAGCgccaccATGAGGCGCGCGCCTTCCTGGT | | CTTGAAGGTACCCTGTTGGTCACGCTGGGCAGCGTAGGGC | |
| 5 ^a $\alpha 3$ | CTTGAAGGTACCGCACCTTCAGAGGCTGAGCACCGTCTATTTGA GCG | | CTTGAAGCGGCGCGCTTATGCATCTTCCTGGCCATCAGGGGT TG | |
| $\beta 4$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ NheI/EcoRI/ KpnI/XhoI | Oligo directo (1 ^{er} paso de PCR) | Oligo inverso (1 ^{er} paso de PCR) | Oligo directo (2 ^o paso de PCR) | Oligo inverso (2 ^o paso de PCR) |
| 1 ^a $\beta 4$ | NheI Kozac CTTGAAGCTAGCgccaccATG AGGCGCGCGCCTTCCTGG T | CTTGAAGAATTCCTGTTGGTCA CGCTGGGCAGCGTAGGGC | - | - |
| 2 ^a $\alpha 3$ | CCTGTGAATTCGCACCTTCA GAGGCTGAGCACCGTCTAT TTGAGC | GGTGCTGCAGCCTGTTGCTGT GTGCATCTTCCTGGCCATCAG GGG | CCTGTGAATTCGCACCTTC AGAGGCTG | TTTAAGGTACCCTGTTGAGCA GGTGCTGCAGCCTGTTGCTG TTGTG |
| 3 ^a $\alpha 3$ | CTTGAAGGTACCGCACCTTC AGAGGCTGAGCACCGTCTA TTTGAGCG | CTTGAAGTCTGAGTTATGCATCT CCCTGGCCATCAGGGGTTG | - | - |

Las secuencias en negrita pertenecen a los extremos 5' o 3' de las subunidades indicadas; el resto de la secuencia forma parte del elemento enlazador añadido. Los sitios de restricción se muestran subrayados

4. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron:

| Segmento | Números de Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|----------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 | 1 | 95 | 1 |
| 2 | 5 | 95 | 0,67 |
| | | 58 | 1 |
| | | 72 | 2 |
| | 5 | 95 | 0,67 |
| | | 56 | 1 |
| | | 72 | 2 |
| | 10 | 95 | 0,67 |
| | | 54 | 1 |
| | | 72 | 2 |
| 3 | 1 | 72 | 10 |
| 4 | 1 | 6 | 1 |

A continuación, los productos de PCR resultantes se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se aislaron del plásmido molde mediante el uso de un kit comercial para la extracción de ADN en geles (Qiagen). Cada subunidad por separado se subclonó en el vector pSUNA previamente desfosforilado (para incrementar el rendimiento de la ligación), usando los sitios de restricción añadidos a cada una de las subunidades, presentes también en el SCM del vector pSUNA, según la posición que ocuparán éstas en el concatémoro. Se recuerda que para ambos trómeros los sitios de restricción eran:

1ª subunidad ($\beta 4$): NheI/EcoRI

2ª subunidad ($\beta 4$ o $\alpha 3$): EcoRI/KpnI

3ª subunidad ($\alpha 3$): KpnI/XhoI

Para el dímero β - α , las subunidades se clonaron entre los sitios de restricción que se muestran a continuación:

1ª subunidad ($\beta 4$): NheI/KpnI

2ª subunidad ($\alpha 3$): KpnI/NotI

Tanto la ausencia de mutaciones no deseadas, como la correcta inserción de los enlazadores y sitios de restricción que flanquean la región codificante de las subunidades se verificaron por secuenciación completa de los plásmidos pSUNA que las portaban (DNA Sequencing Service, Cancer Institute and Wolfson Institute for Biomedical Research, University College London, Londres, Reino Unido).

Ensamblaje de las subunidades para creación de los trímeros y dímero.

La construcción del trímero $\beta 4_ \beta 4_ \alpha 3$ se llevó a cabo en primer lugar. La subunidad $\beta 4$ en primera y segunda posición del trímero fueron digeridas por las enzimas de restricción correspondientes a los sitios que las flanquean (NheI/EcoRI en el primer caso y EcoRI/KpnI en el segundo). Al mismo tiempo, el plásmido pSUNA que porta la subunidad $\alpha 3$ para la tercera posición del trímero se digirió con las enzimas NheI/KpnI, de forma que en un mismo paso de ligación las subunidades $\beta 4$ para la primera y segunda posición se pudieran unir a la subunidad $\alpha 3$ quedando ésta en tercera posición en el mismo vector que porta a esta subunidad. Así, el extremo 5' de la primera subunidad $\beta 4$ se ligó al extremo 3' del vector pSUNA por el sitio NheI; a su vez, el extremo 5' de la segunda subunidad $\beta 4$ quedó ligada al extremo 3' de la primera subunidad $\beta 4$ por el sitio EcoRI; y por último, el extremo 3' de la subunidad $\alpha 3$ se ligó al extremo 3' de la segunda subunidad $\beta 4$ por el sitio KpnI.

La construcción del trímero $\beta 4_ \alpha 3_ \alpha 3$ se realizó eliminando la segunda subunidad $\beta 4$ del trímero $\beta 4_ \beta 4_ \alpha 3$ mediante su digestión con las enzimas EcoRI y KpnI y ligando la subunidad $\alpha 3$ correspondiente a esta posición, habiendo sido previamente digerida por las enzimas mencionadas para obtener los extremos cohesivos adecuados.

Para la construcción del dímero, el plásmido que porta la subunidad $\beta 4$ que quedará en primera posición se digirió con las enzimas KpnI/NotI. Como se ha explicado previamente el sitio KpnI flanquea el extremo 3' de esta subunidad del futuro dímero y el sitio NotI se posiciona en el SCM del plásmido pSUNA, cadena abajo del sitio KpnI (ver apartado 3.1.1.1). La subunidad $\alpha 3$ para la segunda posición del dímero se digirió

con las enzimas mencionadas y se ligó entre los sitios KpnI y NotI, a continuación de la primera subunidad $\beta 4$ del dímero, quedando éste formado.

Construcción de trímeros y dímero mutantes L9'T.

Finalmente, se crearon los trímeros $\beta 4L9'T$ _ $\beta 4$ _ $\alpha 3$ y $\beta 4L9'T$ _ $\alpha 3$ _ $\alpha 3$, y el dímero $\beta 4L9'T$ _ $\alpha 3$ mutantes. En el caso de los trímeros, se partió de la subunidad $\beta 4$ correspondiente a la primera posición de ambos trímeros y se localizó el aminoácido leucina a mutar (L^{272}) para el diseño de los cebadores a partir de la secuencia anterior y posterior al aminoácido mencionado (ver Fig. 16). Una vez mutada, la subunidad $\beta 4L9'T$ se insertó entre los sitios de restricción NheI y EcoRI de los trímeros $\beta 4$ _ $\beta 4$ _ $\alpha 3$ y $\beta 4$ _ $\alpha 3$ _ $\alpha 3$, en los que previamente se había eliminado la primera subunidad $\beta 4$ por digestión con las mencionadas enzimas. En el caso del dímero, la mutación se introdujo directamente sobre la subunidad $\beta 4$ componente del mismo, por lo que se usó al propio dímero como ADN molde en la reacción de PCR.

Las mutaciones se introdujeron usando el kit comercial QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Reino Unido). Para el diseño de los oligonucleótidos (Fig. 16) e inserción de la mutación se siguieron las mismas especificaciones expuestas en el apartado 3.1.1.1 de esta sección, aunque se hicieron una serie de modificaciones, tal y como se describe a continuación:

1. Los oligonucleótidos cebadores se diluyeron hasta una concentración final de 10 μ M para ser usados en la reacción de PCR que introducirá la mutación.
2. La mezcla de reactivos para la reacción de PCR fue la siguiente:

5 μ l del tampón de reacción 10X

150 ng de ADNc plasmídico $\beta 4$ o $\beta 4$ _ $\alpha 3$

1,2 μ l del cebador con sentido (10 μ M)

3 μ l del cebador anti-sentido (10 μ M)

3 μ l de DMSO

3 μ l de dNTPs (de una dilución stock de 10 mM)

1 μ l de enzima Pfu (2,5 U/ μ l del stock)

3. Las condiciones para la reacción de PCR fueron las siguientes:

| Segmento | Números de Ciclos | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|----------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 | 1 | 95 | 1 |
| 2 | 15 | 95 | 0,5 |
| | | 55 | 1 |
| | | 68 | 12 |

4. Tras la reacción de PCR, se añadió 1 μ l de enzima DpnI a la mezcla de PCR para degradar el ADN molde metilado (ADN no mutado), y dejar intacto solo el ADN de nueva formación (no-metilado y conteniendo la mutación deseada).

5. Se transformaron bacterias *E. Coli DH5 α* competentes con 30 μ l del producto de la anterior PCR ($\beta 4L9'T$ _ $\alpha 3$ ó la subunidad $\beta 4L9'T$). Tras seguir el protocolo 62 estándar se aisló el ADN plasmídico de las bacterias mediante miniprep (Qiagen) y el ADN plasmídico purificado se secuenció en su totalidad para confirmar la presencia de la mutación deseada y descartar la presencia de otras posibles mutaciones.

| | | | | |
|---|----------------|------|--------------------------|--|
| 800 | 810 | 814 | 820 | 830 |
| 5'... | CTGTGCATCTCAGT | GCTG | CT GGCACTGACATTCT | CCTG...3' silvestre (leucina 272= CTG) |
| 5'... | CTGTGCATCTCAGT | GCTG | AC GGCACTGACATTCT | CCTG...3' mutante (treonina 272 = ACG) |
| Oligo directo 5' a 3': GATAAGGATCCGGGCTGGCGATTTAAATAAGAGGCCCGCACCGATCGCC | | | | |
| Oligo antisentido 5' a 3': GGCGATCGGTGCGGGCCTCTTATTTAAATCGCCAGCCCGGATCCTTATC | | | | |
| Temperatura de fusión= 81.1 °C | | | | |
| Bases = 39 | | | | |
| Contenido en bases GC= 53.8% | | | | |
| Bases desapareadas = 2 | | | | |

Fig. 16. Secuencias de la subunidad $\beta 4$ silvestre y mutada ($\beta 4L9'T$). Las bases silvestres y mutadas se muestran en negrita. Los oligos usados para la introducción de la mutación en las posiciones 814 y 815 de la secuencia de nucleótidos de la subunidad y sus características se muestran en la figura.

3.1.2.-TRANSCRIPCIÓN *IN VITRO* DE ARNm

Tras la extracción del ADNc plasmídico mediante miniprep, los productos de ADNc obtenidos fueron cuantificados mediante espectrofotometría para determinar las

cantidades de ADN plasmídico obtenidas. Tras esto, los ADNc fueron linealizados, purificados y precipitados. Para la obtención del material genético lineal, el ADNc incluido en el vector pSP64T se cortó con la enzima de restricción Xba I (New England BioLabs, Inc., Ipswich, Reino Unido); el vector pSP64 poli A que incluía el ADNc $\beta 2$ humano se cortó con la enzima de restricción Pvu II (Fermentas internacional Inc, Canadá), mientras que para el que incluía la ADNc $\alpha 4$ se utilizó la enzima Vsp I (Fermentas internacional Inc, Canadá); por otro lado, se utilizó la enzima Not I (Fermentas internacional Inc, Canadá) para linealizar el vector p642; por último, los vectores pSUNA conteniendo los trímeros y dímeros silvestres o mutantes se linealizaron todos con la enzima Swa I, facilitando de esta manera la posterior transcripción de los ADNc a ARNm. Tras la linealización, el ADN se purificó mediante su precipitación por acetato amónico 5M, diluyéndose con agua después hasta una concentración en torno a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Posteriormente, a partir de estos ADNc lineales se llevó a cabo la transcripción para obtener ARNm de cada una de las subunidades bovinas, humanas y de los trímeros y dímeros creados. Para la síntesis del ARNm de las subunidades monoméricas bovinas y humanas se utilizó la ARN-polimerasa polSP6, mientras que para la síntesis del ARNm de los trímeros y dímeros se utilizó la polT7, utilizando en todos los casos el kit comercial mMessage mMachine (Ambion). Este ARNm resultante fue purificado mediante el kit MEGAClear (Ambion). Finalmente los productos fueron cuantificados nuevamente mediante espectrofotometría y se llevaron a cabo las diluciones pertinentes hasta alcanzar la concentración deseada en agua libre de ARNasa. Se realizaron alícuotas de estos mensajeros y se conservaron a -80°C .

3.2.-Sistema de expresión

Como sistema de expresión heteróloga de nuestras proteínas de interés se utilizaron los ovocitos extraídos de hembras adultas del sapo africano *Xenopus laevis* proporcionados por un suministrador comercial (Xenopus Express, Francia) a los que se les inyectó el ARNm previamente sintetizado, descrito en el apartado anterior. Como consecuencia de la inyección del mensajero se produce la traducción a proteína a través de la maquinaria biosintética interna del ovocito, dando como resultado la expresión de un receptor funcional en la membrana del ovocito. La caracterización electrofisiológica se realizó mediante la técnica de fijación de voltaje de doble electrodo (FVDE) y el registro de canal único mediante la técnica de patch-clamp (RCU o en inglés SchR).

3.-EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS OVOCITOS DE *X. LAEVIS*

Previamente a la intervención quirúrgica, los sapos se anestesiaron introduciéndolos en una solución de tricaina (sal de etil 3-aminobenzoato metanosulfonato, SIGMA, Madrid, España) al 0.2% durante 30 minutos. Los ovocitos se extrajeron a través de una incisión hecha en el abdomen. Los lóbulos ováricos extraídos, se situaron en una placa de cultivo de 60 mm que contenía una solución de Medio L15 (L5520 SIGMA) + HEPES (20 mM) en una proporción 1:1 y se mantuvieron en un incubador a 16- 18 °C.

La operación se realizó en condiciones de limpieza, pero sin necesidad de utilizar material estéril. Los *Xenopus* tienen la capacidad de secretar un péptido denominado magainina con propiedades antimicrobianas, que facilita la recuperación del sapo tras la operación, sin necesidad de aportar antibióticos o antifúngicos al animal.

Para la reanimación del sapo se introdujo a éste en un recipiente con agua a temperatura ambiente, de tal forma que la recuperación del animal se produce en 15-30 minutos.

Con motivo de facilitar la inyección del mensajero y evitar interferencias en los registros electrofisiológicos posteriores, se procedió a la separación de la membrana folicular de los ovocitos. La extracción de la membrana folicular puede hacerse por métodos mecánicos (manualmente) o por tratamientos enzimáticos (colagenasa). Ambos métodos son viables, si bien la retirada de las membranas del ovocito de manera manual es más lenta y pesada ofrece ovocitos de mejor calidad, de manera que la opción elegida en nuestro caso fue esta última, sirviéndonos de la ayuda de pinzas de punta muy fina y una lupa. (Ver Fig. 17).

Los ovocitos desprovistos de la membrana folicular son traspasados a un medio BARTH con Ca^{2+} (composición en mM: NaCl 88; KCl 1; NaHCO_3 2,4; MgSO_4 0,82; TRIS 7,5; CaCl_2 0,41; $\text{Ca}(\text{NO}_3)$ 0,33, pH 7,4 con NaOH; estéril en presencia de 10 U.ml-1 de penicilina y 10 $\mu\text{g}.$ ml-1 de estreptomycin) donde se dejarán reposar hasta el momento de la inyección del ARNm a 4 °C.

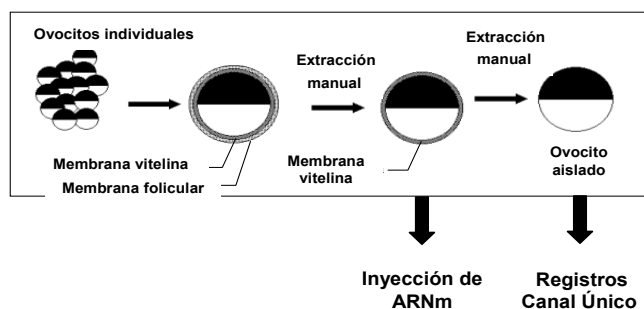
A. *Xenopus laevis* “sapo de uñas sudafricano”**B. Obtención de los ovocitos****C. Obtención de ovocitos aislados**

Fig. 17. Material biológico. (A) Para la expresión heteróloga del receptor nicotínico se utilizaron ovocitos extraídos del sapo *Xenopus laevis*. (B) El animal anestesiado y operado a fin de obtener parte de los folículos ováricos. Los ovocitos son separados y su membrana folicular extraída manualmente. (C) La eliminación de la capa folicular da lugar a un ovocito preparado para ser inyectado con el ARNm de las subunidades del receptor nicotínico en estudio. La eliminación de la membrana vitelina a los ovocitos inyectados con ARNm y expresando receptores en su membrana da lugar a un ovocito limpio, listo para los registros de canal único.

3.2.1.-INYECCIÓN DE ARNm

El proceso de inyección del ARNm es uno de los pasos más críticos en este proceso de expresión heteróloga, ya que si no se realiza con rigor, se puede provocar la muerte del ovocito, así como la pérdida de buenos registros. El proceso de inyección se realiza bajo la lupa mediante un microinyector acoplado a un micromanipulador con

capacidad de movimientos precisos y tridimensionales y consiste en la introducción de un capilar de inyección en el interior del citoplasma del ovocito, atravesando su membrana.

Para la inyección del ARNm se utilizaron capilares de borosilicato proporcionados por Drummond Scientific Company. Estos capilares fueron estirados en un estirador vertical de vidrio (modelo PP-830 Narishige, Tokio, Japón)

Debido a que estos capilares van a estar en contacto con el ARNm y que esta molécula se degrada con suma facilidad por la acción de las ARNasa, se deben extremar las precauciones en la manipulación del capilar, utilizando en todo momento guantes, a fin de evitar la contaminación con ARNasas presentes en las manos del manipulador.

Previamente al uso del capilar estirado, se rompe la punta con ayuda de unas pinzas de punta fina libres de ARNasa para crear una punta fina y biselada de una longitud aproximada a 3 mm con un diámetro externo entre 1 a 1,5 μm . El capilar se rellenó con la ayuda de una jeringa de insulina acoplada a unas microagujas de inyección (World Precision Instruments, Stevenage, Reino Unido) con aceite mineral. Este aceite sirve de sustancia de relleno del capilar haciendo que la presión ejercida por el inyector a lo largo del mismo sea constante. Además, al ser inmisible con el agua evita pérdidas de ARNm y permite monitorizar la inyección al observarse bajo la lupa la separación de las fases ARNm-agua y aceite. Una vez relleno con el aceite, el capilar se acopla al inyector (nanoliter 2000, World Precision Instruments, Stevenage, EE.UU.) de manera hermética. La muestra de ARNm se deposita en superficie estéril libre de ARNasa y se procede a la recogida del mismo a través del capilar. Se evitará la entrada de aire.

La inyección se realiza con el inyector (nanoliter 2000, World Precision Instruments, Stevenage, Reino Unido). El proceso se realiza de manera individual, inyectando a cada ovocito un volumen de 46 nl de ARNm a distintas concentraciones, tal y como se describe a continuación:

- formación de receptores homoméricos $\alpha 7$ (humanos y bovinos): se inyectó a cada ovocito 46 nl de ARNm a una concentración de 250 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, es decir, 11,5 ng de ARNm.
- formación de receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ humano: se co-inyectaron los ARNms de las dos subunidades a la misma concentración (250 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) con la estequiometría 1:1, inyectándose un volumen final de 46 nl a cada ovocito (5,75 ng de ARNm $\alpha 4$: 5,75 ng de ARNm $\beta 2$)

- formación de receptores heteroméricos $\alpha 3\beta 4$ bovinos: se co-inyectaron los ARNm de las dos subunidades en las siguientes proporciones: 1:1, 1:9 y 9:1 para la creación de las distintas estequiometrías, manteniendo siempre la concentración final de ARNm de $250 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, inyectándose un volumen final de 46 nl a cada ovocito (5,75 ng de ARNm $\alpha 3$: 5,75 ng de ARNm $\beta 4$ para la estequiometría 1:1; 1,15 ng de ARNm $\alpha 3$: 10,35 ng de ARNm $\beta 4$ para la estequiometría 1:9; 10,35 ng de ARNm $\alpha 3$: 1,15 ng de ARNm $\beta 4$ para la estequiometría 9:1).
- formación de receptores heteroméricos $\alpha 3\beta 4$ humanos: se co-inyectaron los ARNm de las dos subunidades en las siguientes proporciones: 1:1, 1:9 y 9:1 para la creación de las distintas estequiometrías, manteniendo siempre la concentración final de ARNm de $110 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, inferior que en el caso del mensajero bovino debido a la gran magnitud de las corrientes humanas, inyectándose un volumen final de 46 nl a cada ovocito (2,5 ng de ARNm $\alpha 3$: 2,5 ng de ARNm $\beta 4$ para la estequiometría 1:1; 0,5 ng de ARNm $\alpha 3$: 4,5 ng de ARNm $\beta 4$ para la estequiometría 1:9; 4,5 ng de ARNm $\alpha 3$: 0,5 ng de ARNm $\beta 4$ para la estequiometría 9:1).
- formación de receptores concateméricos $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 4^{\text{L9T}}$ humanos: se co-inyectaron los ARNm del dímero con el trímero correspondiente en función de la estequiometría del receptor en estudio en una proporción 1:1, manteniendo siempre la concentración final de ARNm de $520 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, mayor que en los casos anteriores debido a la pequeña magnitud de las corrientes de los receptores concateméricos, inyectándose un volumen final de 46 nl a cada ovocito (12 ng de ARNm trímero : 12 ng de ARNm dímero).

Una vez concluido el proceso de inyección se procedió al cultivo de los ovocitos. Los ovocitos se pasan a un medio de cultivo más rico en nutrientes como es el medio L-15 + HEPES 20mM 1:1 estéril en presencia de $10 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de penicilina y $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de estreptomycin y se mantienen en un incubador a una temperatura constante de 16-18 °C por siete días máximo. El medio de cultivo debe cambiarse a diario y los ovocitos dañados se eliminaron para minimizar la degradación enzimática de los ovocitos sanos.

3.3.-Registros electrofisiológicos en ovocitos de *Xenopus laevis*.

3.3.1.-FIJACIÓN DE VOLTAJE DE DOBLE ELECTRODO

Todas las medidas se realizaron al cabo 2-6 días tras la inyección del ARNm. Las corrientes de membrana se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje de doble electrodo (Campos-Caro y col., 1997) con un amplificador Oocyte Clamp OC-725C (Warner Instruments Corp, Hamden, USA), usando electrodos de voltaje y corriente con resistencias de 2-5 M Ω , hechos de borosilicato (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) y rellenados con KCl 3 M. Los ovocitos se mantuvieron en una cámara con un volumen de 0.6 ml. Para la adquisición de los datos, la aplicación de agonistas y el posterior análisis de los registros se utilizó el programa informático pClamp 5.03 (Axon Instrument, Union City, CA, USA). Las corrientes se obtuvieron filtrando la señal a 50 Hz mediante el filtro Bessel y usando la interfase Digidata 1200. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (22-24° C), utilizando como solución de registro extracelular Oocyte Ringer Ba²⁺ que contenía (en mM): 82,5 NaCl, 2,5 KCl, 2,5 BaCl₂, 1 MgCl₂ y 5 HEPES, ajustado a pH 7,4 con NaOH. La composición iónica de esta solución carece de catión Ca²⁺, que es sustituido por Ba²⁺ como ión transportador de carga, evitando de esta manera la activación de los canales de cloruro activados por Ca²⁺ presentes de forma endógena en la membrana del ovocito. Los agonistas fueron aplicados por gravedad a través de una pipeta, cuyo diámetro interno fue de 1.2 mm con su punta localizada cerca del ovocito. El flujo de las soluciones de agonista fue de 12 ml/min y el flujo de perfusión basal fue de 7 ml/min. El potencial de reposo se fijó a -70 mV, excepto cuando se indica lo contrario. Para cada tipo de experimento se utilizaron ovocitos de al menos dos donadores distintos.

3.3.2.-REGISTROS DE CANAL ÚNICO

Todas las medidas se realizaron al cabo 3-6 días tras la inyección del ARNm, en configuración de célula adherida utilizando ovocitos a los que se les había separado la membrana vitelina previamente tras su incubación en una solución hiperosmótica (solución Barth Ca²⁺ con sacarosa 4 M). Se utilizaron electrodos de borosilicato recubiertos con Sylgard® 184 y pulidos con calor para tener una resistencia final de 5 a 15 M Ω . Los electrodos se rellenaron con solución extracelular divalente que contenía (en mM) 150 NaCl, 2,8 KCl, 0,5 MgCl₂, 0,5 CaCl₂, 10 HEPES, 0,5 atropina, ajustado a pH 7,2 con NaOH, y que contenía Ach 5 μ M como agonista. En ausencia de Ach no se registraron aperturas de canales, solo aquellos atribuibles a los canales activados por tensión, presentes en la membrana del ovocito. Los ovocitos se bañaron con solución

con alto potasio que contenía (en mM) 100 KCl, 10 HEPES, 10 EGTA, ajustado a pH 7,2, con NaOH, con el objetivo de conducir el potencial de membrana en reposo a un valor constante cercano a 0. Los registros se obtuvieron filtrando la señal a 3 kHz mediante el filtro Bessel y digitalizadas a 30 kHz. Se midió la amplitud de las aperturas de los canales a distintos potenciales (-30, -40, -60, -80 y -100 mV), realizando de tres a cuatro parches por ovocito, utilizando al menos dos ovocitos por experimento. La media de las amplitudes obtenidas para cada potencial se representó frente a los distintos potenciales en una gráfica y los puntos representaron se ajustaron a una línea recta para obtener la conductancia del canal a partir de la pendiente de la recta.

3.4.-Registros electrofisiológicos en células cromafines bovinas.

3.4.1.-AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS

Las células cromafines de la médula adrenal bovina se aislaron a partir de glándulas adrenales de vacas adultas, siguiendo un protocolo estandarizado (Livett, 1984) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio (Moro y *col.*, 1990)

Las glándulas extraídas del animal en el matadero se transportaron en medio de Locke (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}), cuya composición es: 154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,5 mM NaHCO_3 ; 5,6 mM glucosa; 10 mM HEPES; penicilina (50 UI/ml)/estreptomicina (0,05 mg/ml); pH 7,4. Una vez en la unidad de cultivos, se retiró el tejido graso periadrenal y se eliminaron los eritrocitos existentes en el sistema vascular mediante la inyección de Locke a través de la vena adrenolumbar. A continuación se inyectaron, también a través de la vena adrenolumbar, 3,5 ml de solución enzimática de collagenasa (collagenasa al 0,25% + albúmina de suero bovina (BSA) al 0,5%, disueltas en Locke) y se incubó la glándula a 37°C. La inyección de collagenasa se repitió hasta un total de 3 veces, a intervalos de 20 min.

Finalizada la digestión enzimática, se seccionó la glándula longitudinalmente y se extrajo la médula ya digerida, que se lavó mediante la adición de grandes volúmenes de Locke. La suspensión así obtenida se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 217 μm , que permite eliminar fragmentos de médula no digeridos. La suspensión filtrada se centrifugó (120xg, 10 min) y el precipitado se resuspendió en Locke, tras lo cual se obtuvo una nueva suspensión celular que se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro menor, de 82 μm , que permite la eliminación de grasa y de fibras.

A continuación se separaron y purificaron las células mediante un gradiente de Percoll, para lo cual se añadió Percoll estéril a la suspensión celular y se centrifugó a 20.000xg, durante 20 min, a 15°C. Tras esta centrifugación se observan varias bandas en el gradiente, entre las que destacan una superior con una mezcla de células cromafines adrenérgicas y noradrenérgicas y una inferior de cromafines principalmente adrenérgicas. Se recogieron las células contenidas en estas dos capas y se realizó un primer lavado del Percoll, añadiendo grandes cantidades de Locke y centrifugando (120xg, 10 min). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Se centrifugó de nuevo (120xg, 10 min) y el precipitado resultante de esta última centrifugación se resuspendió en DMEM al que se le había añadido: 5% de suero bovino fetal, inhibidores de fibroblastos (10 μ M de citosina-arabinósido y 10 μ M de fluorodeoxiuridina) y antibióticos (penicilina (50 UI/ml) /estreptomicina (0,05 mg/ml)).

Para los experimentos de *patch-clamp* las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 1 cm de diámetro (previamente tratados con poli-D-lisina para facilitar la adhesión de las células) a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células/cubre. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador con atmósfera saturada de agua y 5% de CO₂. Las células se emplearon 24-96 h tras la siembra.

3.4.2.-REGISTRO DE CORRIENTES NICOTÍNICAS EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS MEDIANTE LA TÉCNICA DE *PATCH-CLAMP*

Para el registro de las corrientes iónicas que fluyen a través de los nAChRs en las CCB, los cubreobjetos conteniendo las células se colocaron sobre una cámara experimental de metacrilato montada sobre la platina de un microscopio invertido Nikon Diaphot. La cámara se perfundió continuamente con una solución control de Krebs-HEPES (KH) conteniendo (en mM): 137 NaCl; 5,9 KCl; 1 MgCl₂; 2 CaCl₂; 10 HEPES; pH 7,4. Las células se dializaron, al utilizar la configuración de célula entera, con una solución intracelular conteniendo (en mM): 10 NaCl; 100 CsCl; 20 TEA.Cl; 14 EGTA; 5 Mg.ATP; 0,3 Na.GTP; 20 HEPES; pH 7,2.

El potencial de membrana de las células se fijó a -80 mV. Las pipetas se fabricaron a partir de capilares de vidrio de borosilicato (Kimax-51[®], Kimble Glass Inc., diámetros 1,5-1,8 mm x 100 mm) con ayuda de un estirador vertical (modelo PP-830, Narishige, Tokio, Japón), aplicando calor en dos pasos sucesivos. La punta de las pipetas se pulió al calor de una resistencia en una microforja (MF-830, también de Narishige),

hasta que su diámetro interior era de aproximadamente 1 μm ; la resistencia de las pipetas así obtenidas, una vez rellenas con la solución intracelular, fue de 3-4,5 M Ω .

Las corrientes nicotínicas se indujeron mediante la aplicación rápida del agonista ACh a través de una pipeta de perfusión formada por varios tubos de polietileno de pequeño diámetro (de 0,28 a 0,58 mm diámetro interno), insertados dentro de una punta de pipeta de manera que no queden espacios entre los tubos y la pared de la pipeta. Al final de la pipeta todos los tubos desembocan en una salida común, la cual se situó a unos 100 μm de la célula. Cada uno de los tubos se conecta por su extremo posterior a un reservorio donde se acumulan las soluciones de trabajo y el flujo de cada una de las vías se controla electrónicamente mediante válvulas solenoides excluyentes (The Lee Company, Westbrook, CT, EEUU), de tal modo que sólo una de las válvulas puede permanecer abierta en el mismo periodo de tiempo. La velocidad del flujo fue de aproximadamente de 1 ml/min y regulada por gravedad, lo que permitía un cambio completo de soluciones en los alrededores de la célula en menos de 100 ms (Fig. 18).

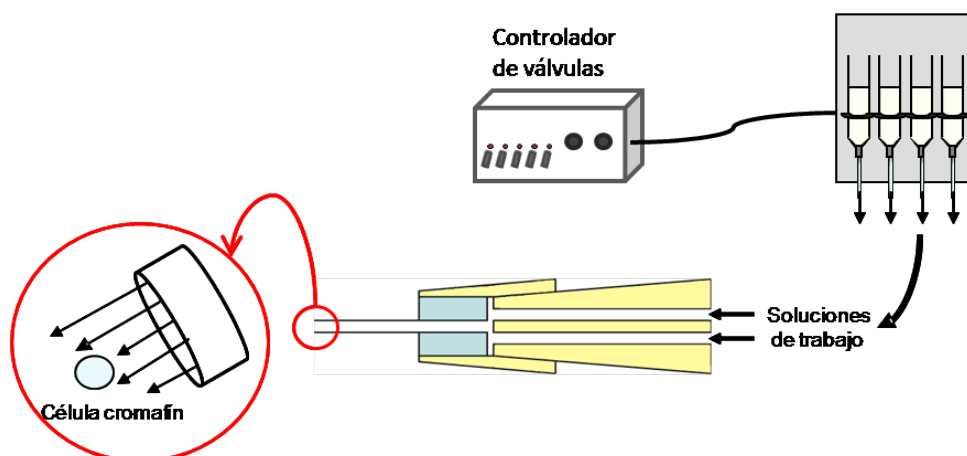


Fig. 18. Esquema del sistema de perfusión y detalle apical de la pipeta de perfusión utilizada.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) con las pipetas montadas sobre el preamplificador de un amplificador de *patch-clamp* EPC-9 (HEKA Elektronik, Lambrecht, Alemania), con una interfase ITC-16 AD/DA integrada. Para la adquisición de datos y para el control automático de la apertura de las válvulas se empleó el *software* PULSE (también de HEKA). Las células se estimularon mediante la aplicación de pulsos de agonista de 250 ms a intervalos de 30 s y los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 50 kHz.

3.4.-Modelado Molecular.

Los estudios de modelado molecular se llevaron a cabo con el programa QUANTA/CHARMm (Accelrys, París, Francia).

El complejo formado por Aplysia AchBP-epibatidina (2BYQ) se obtuvo de la base de datos "Protein Data Bank" y se utilizó como molde para el receptor $\alpha 7$. Finalmente, el ligando epibatidina se eliminó y se llevó a cabo una minimización de energía para eliminar los contactos más estrechos.

La molécula oxotremorina M (oxo-M) se ensambló con QUANTA usando longitudes de y ángulos de enlace estándar. Se minimizó la energía mecánica usando campos de fuerza CHARMm. La molécula de oxo-M se ancló manualmente en el bolsillo de unión, teniendo en cuenta la posición ocupada por la epibatidina en el complejo Aplysia AchBP-epibatidina.

El modelo del receptor nicotínico $\alpha 3\beta 4$ se obtuvo también de "Protein Data Bank" (1OLJ). La molécula de oxo-M se ancló manualmente en el bolsillo de unión, teniendo en cuenta la posición ocupada por la nicotina y A-84543, publicado por Yuan.

El modelo del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ se obtuvo también de "Protein Data Bank" (2GVT). La molécula de oxo-M se ancló manualmente en el bolsillo de unión, teniendo en cuenta la posición ocupada en el receptor $\alpha 3\beta 4$.

Finalmente, los complejos correspondientes a los receptores-ligandos se minimizaron mediante el método de Newton Raphson, considerando que las estructuras estaban completamente optimizadas cuando los cambios de energía entre dos iteraciones sucesivas era menos de 0.01 Kcal/mol .

3.5.-Soluciones y compuestos químicos utilizados.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se han utilizado los siguientes compuestos: suero bovino fetal y suero de caballo (Gibco, Madrid, España); PNU-120596 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). El resto de los reactivos, a menos que se indique lo contrario, fueron obtenidos de Sigma (Madrid, España).

3.6.-Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error de la media estándar (EMS). Las curvas concentración-respuesta y el cálculo de la concentración de agonista que produce la mitad de la respuesta máxima o bloqueo máximo (CE50/CI50), así como el coeficiente de Hill se realizaron mediante el programa de análisis de gráficos Origin 7.0

(Microcalc Software Inc.), ajustando las respuestas a las distintas concentraciones de agonista a la siguiente ecuación:

$$A2 + [A1 - A2] / [1 + 10^{[(\log(X0 - X))^p]}],$$

donde A2 es la concentración que produce la respuesta máxima, A1 es la concentración a la que se produce la mínima respuesta, $\log(X0 - X)$ representa la concentración que produce la mitad de la respuesta máxima (p.e. CE50 o CI50) y p representa el coeficiente de Hill.

Las diferencias estadísticas entre las medias se determinaron a través de la t de Student (t-Test). La diferencia estadísticamente significativa, asignada por la puntuación *, se estableció por un valor de $p \leq 0,05$; la puntuación ** y *** se asignaron para una diferencia altamente significativa en los valores estudiados ($p \leq 0,01$ y $p \leq 0,001$, respectivamente).

4.-RESULTADOS.

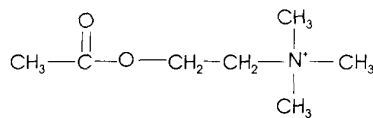
4.1.-ESTUDIO DEL EFECTO DE LA OXOTREMORINA-M SOBRE DISTINTOS SUBTIPOS DE RECEPTORES NICOTÍNICOS

Como ya hemos mencionado en otros apartados de esta tesis, la estequiometría del receptor $\alpha 3\beta 4^*$ presente en la célula cromafín bovina no se ha elucidado todavía. Se ha descrito la existencia de ARNm que codifica para las subunidades $\alpha 7$ (García-Guzmán y col., 1995), $\alpha 3$ y $\beta 4$ (Criado y col., 1992; Campos-Caro y col., 1997) y $\alpha 5$ (Campos-Caro y col., 1997), aunque aún no se ha demostrado si todas estas subunidades se asocian para dar lugar a un receptor heteromérico complejo $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)\alpha 7$ o si existen en diferentes combinaciones de subunidades formando distintas subpoblaciones de receptores en la membrana de la célula cromafín bovina, por ejemplo, receptores de subtipo $\alpha 7$ y receptores de subtipo $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)$. Algunas aproximaciones farmacológicas e inmunológicas (El-Hajj y col., 2007) han demostrado la existencia de receptores $\alpha 7$ tanto homoméricos como heteroméricos. Sin embargo, las evidencias bioquímicas y farmacológicas aportadas por nuestro grupo a lo largo de los últimos años no evidencian la existencia de un receptor homomérico $\alpha 7$ en la membrana de la célula cromafín bovina (Maneu y col. 2002; Rojo y col., 2007; Escalona y col., 2009). Además, la no existencia hasta la fecha de un agonista selectivo para el nAChR $\alpha 3\beta 4$ dificulta enormemente la caracterización de la estequiometría del receptor presente en la célula cromafín bovina.

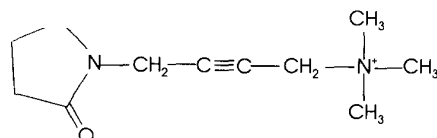
En relación con esta caracterización farmacológica y búsqueda de nuevos agonistas nicotínicos, en el presente trabajo se ha propuesto la caracterización del efecto de la oxotremorina M sobre distintos subtipos de nAChR. La oxotremorina M (oxo-M) es una sal de trimetilamonio derivada de la molécula de oxotremorina (Bebbington y col., 1966) y se ha descrito que ambas moléculas inducen hipotermia, tremor, salivación, bradicardia, hipotensión e hipermovilidad intestinal (Everett y col., 1956; Eshel y col., 1979; Ringdahl y col., 1983). Oxo-M difiere de la molécula de oxotremorina en que la amina terciaria de ésta última es reemplazada por una amina cuaternaria, sustitución que hace a la oxo-M similar a la molécula de acetilcolina y más soluble al agua (Bebbington y col., 1966) (ver Fig. 19). Se ha descrito que tanto oxo-M como la oxotremorina son potentes agonistas muscarínicos (Cho y col., 1962; Lin y col., 1991). Ambas moléculas se han utilizado ampliamente como agonistas selectivos de receptores muscarínicos en una gran variedad de trabajos, tales como estudios de

unión de radioligando (Birdsall y col., 1978; Freedman y col., 1988); estudios farmacológicos en ganglios autónomos (Marrion y col., 1989; Beech y col., 1991); ensayos funcionales (North y col., 1983; North y col., 1985; Duttaroy y col., 2002).

Acetilcolina



Oxotremorina M



Oxotremorina

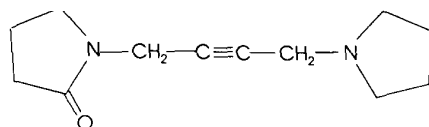


Fig. 19. Estructura química de los agonistas colinérgicos acetilcolina, oxotremorina M y oxotremorina.

Sin embargo, se ha cuestionado la especificidad muscarínica de la oxo-M en diferentes artículos donde se describe que este compuesto también ejerce acciones nicotínicas en la unión neuromuscular del músculo esquelético (Smith, 1982; (Hagglad y col., 1985; Hong y col., 1990); en cultivo de neuronas de cobaya (Xian y col., 1994); en cultivo primario de miocitos de *Xenopus* (Reitstetter y col., 1994); y sobre AChR recombinantes de tipo muscular y neuronal de ratón y rata (Akk y col., 1999). Oxo-M se ha utilizado también en la caracterización de algunos tipos de nAChR con perfil farmacológico mixto nicotínico-muscarínico (Shirvan y col., 1991; Elgoyhen y col., 1994; Verbitsky y col., 2000), estudios realizados bajo el supuesto de la acción muscarínica selectiva como agonista de esta molécula, y donde no se tuvieron en cuenta estas acciones nicotínicas.

En el presente trabajo, abordamos la hipótesis de que la oxo-M actúe como agonista de uno o varios subtipos de nAChR humanos y bovinos, así como su selectividad por alguno de estos subtipos con el fin de encontrar una herramienta farmacológica que nos ayude a arrojar luz sobre la composición estequiométrica del receptor nativo de interés. Así, se realizó la caracterización farmacológica de la acción nicotínica de la

oxo-M en ovocitos de *Xenopus* que expresaban $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ nAChRs humanos y $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ nAChRs bovinos. A continuación, se exponen los resultados más relevantes de este apartado.

4.1.1.-Oxo-M se comporta como un agonista parcial del nAChR $\alpha 3\beta 4$ expresado en ovocitos.

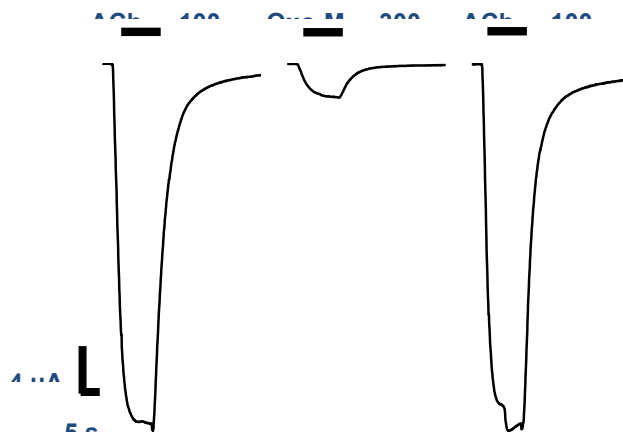
En primer lugar, se estudió el efecto de la oxo-M sobre ovocitos inyectados con ARNm para las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ humanas. La aplicación de pulsos de 5 s a intervalos de 120 s de ACh (100 μ M) u oxo-M (300 μ M) generaron corrientes de entrada en estos ovocitos. La figura 20.A. muestra las corrientes originales de un experimento representativo en el que la aplicación de ACh originó corrientes de entrada caracterizadas por una rápida activación así como por una fase de inactivación más lenta con una constante de tiempo (τ_{off}) de $1.229,64 \pm 56,62$ ms, como se muestra en la tabla 7. La aplicación de oxo-M (300 μ M) al mismo ovocito indujo corrientes de entrada de un $9,73 \pm 1,47$ % respecto a la corriente evocada por ACh 100 μ M, caracterizadas con una cinética similar a la anteriormente descrita para la ACh, aunque ligeramente más desensibilizante ($\tau_{\text{off}} = 1.032,82 \pm 36,98$ ms; $p < 0,05$; t-Test, $n=8$). En la figura 20.B., se representan las correspondientes curvas concentración-respuesta para la ACh y oxo-M en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ humanos ($n=3$, 2 donadores y $n=8$, 3 donadores, respectivamente). Los resultados están resumidos en la tabla 7. Los valores de CE_{50} fueron de $92,95 \pm 13,56$ μ M para la ACh y $269,64 \pm 50,98$ μ M para la oxo-M, lo que sugiere que este compuesto se comporta como un agonista menos potente que la ACh para este subtipo de receptor ($p < 0,05$; t-Test, $n=8$). La máxima amplitud de corriente obtenida por la aplicación de oxo-M se obtuvo con la concentración de 1 mM, que generó respuestas de un $11,01 \pm 0,97\%$ con respecto a las respuestas obtenidas con ACh 1 mM, lo que muestra una menor eficacia de la oxo-M con respecto a la ACh en ovocitos que expresan el receptor $\alpha 3\beta 4$ humano ($p < 0,001$; t-Test, $n=8$).

También se estudió el efecto de la molécula oxo-M sobre ovocitos inyectados con las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ bovinas, obteniendo unos resultados similares. La figura 21.A. muestra corrientes originales de un experimento representativo, generadas por diferentes concentraciones de oxo-M en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ bovinos. Observamos, al igual que en el caso anterior, como la oxo-M induce corrientes con una cinética similar a las evocadas por ACh. La figura 21.B. muestra las curvas concentración-respuesta a ACh y a oxo-M correspondientes a esta población de ovocitos, que mostraron una mayor

sensibilidad a ACh (CE_{50} $171,68 \pm 10,31 \mu M$) que a oxo-M ($234,40 \pm 47,30 \mu M$), aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. Como ocurría en los ovocitos que expresaban el receptor $\alpha 3\beta 4$ humano, oxo-M se comportó como un agonista parcial del receptor bovino, activando corrientes de entrada de un $34,70 \pm 2,68\%$ relativas a la corriente máxima generada por ACh 1 mM, aunque en este caso se comportó como un ligando algo más eficaz que en el caso humano ($p < 0,001$; t-Test, $n=8$).

A

$\alpha 3\beta 4$ humano



B

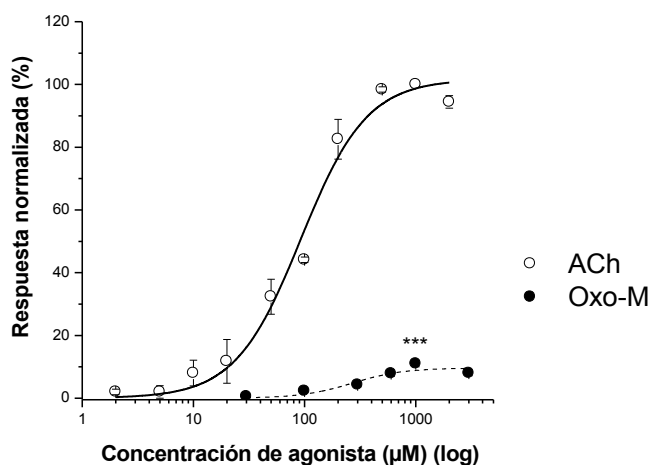


Fig. 20. Efecto de la oxo-M sobre nAChR $\alpha 3\beta 4$ humanos expresados en ovocitos de *Xenopus*. La figura A presenta registros originales de corrientes de entrada representativas, inducidas por ACh (100 μM) y oxo-M (300 μM) en ovocitos que expresan el receptor nicotínico $\alpha 3\beta 4$ humano. El potencial de membrana de las células se mantuvo en -70 mV y se estimularon con pulsos de agonista de 5 segundos de duración, como se muestra en cada trazo (barra sólida), aplicados a intervalos de 2 minutos. En (B) se muestran las curvas concentración-respuesta para las corrientes de célula entera generadas por ACh y oxo-M, respectivamente. Las respuestas están normalizadas respecto a la I_{max} inducida por ACh (ACh 1 mM) y los datos expresados resultan de la media \pm E.M.S de las corrientes procedentes de 3 y 8 ovocitos estimulados con ACh y oxo-M respectivamente. Los ovocitos proceden de al menos 2 donadores distintos. *** $p < 0.001$, cuando comparamos las corrientes evocadas por ACh 1 mM con las corrientes obtenidas con oxo-M 1 mM.

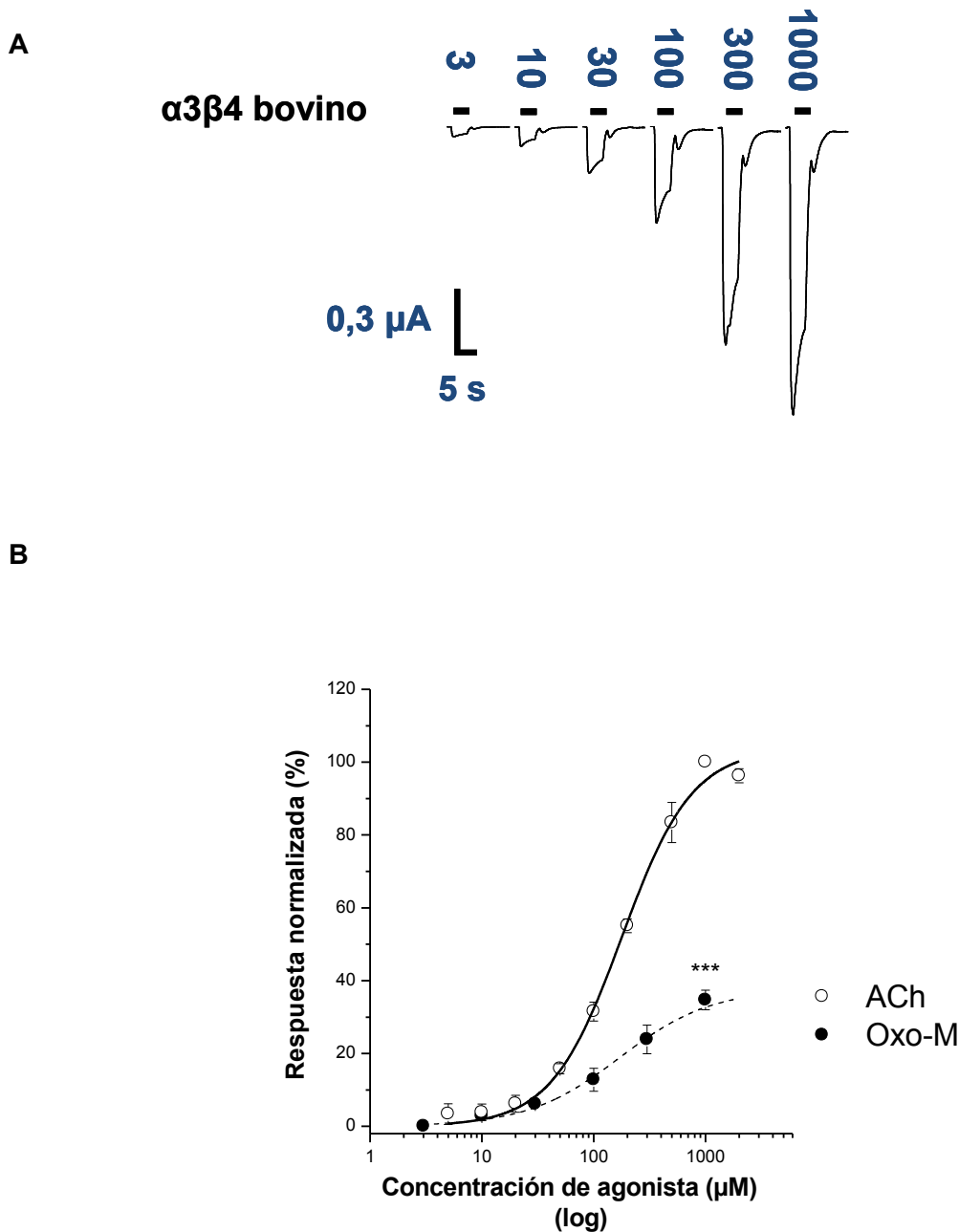


Fig. 21. La aplicación de oxo-M en ovocitos que expresan nAChR $\alpha 3\beta 4$ bovinos originó corrientes de entrada. La figura A muestra registros representativos de corrientes de entrada originadas por distintas concentraciones de oxo-M (desde 3 a 1000 μ M) en ovocitos que expresan receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 4$ bovinos. El potencial de membrana de los ovocitos se mantuvo en -70 mV, y se estimularon con pulsos de agonista de 5 s, como indica la barra horizontal superior del trazo, a intervalos de 2 min. La figura B muestra las curvas concentración-respuesta construidas a partir de las corrientes generadas por distintas concentraciones de ACh and oxo-M en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ bovinos. Las respuestas se expresaron como el porcentaje de las corrientes evocadas por ACh 1 mM. Los datos resultan de la media \pm E.M.S de las corrientes generada en 5 y 8 ovocitos estimulados con ACh and oxo-M respectivamente. Los ovocitos proceden de al menos dos donadores diferentes. *** $p < 0.001$, cuando comparamos las corrientes evocadas por ACh 1 mM con las corrientes obtenidas con oxo-M 1 mM.

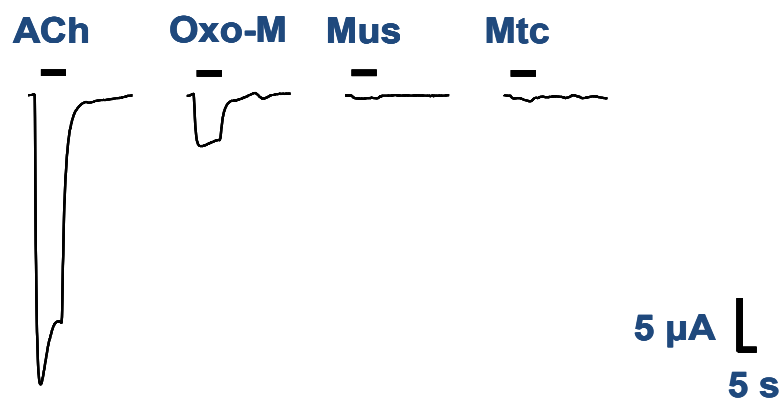
Con el objetivo de caracterizar la naturaleza nicotínica o muscarínica de las respuestas generadas por la oxo-M en los ovocitos $\alpha 3\beta 4$, se evaluó el efecto de la muscarina (clásico agonista muscarínico (Fraser, 1957), de la atropina (antagonista muscarínico (Kishimoto y col., 1984) y de la mecamilamina (antagonista nicotínico, (Martin y col., 1989) sobre estos receptores. En la figura 22.A. y 22.B. se muestran los trazos originales obtenidos de la aplicación de pulsos de 5 segundos de diferentes agonistas colinérgicos a intervalos de 2 minutos en el siguiente orden: ACh (100 μ M; control), oxo-M (1 mM), muscarina (100 μ M) y metacolina (300 μ M). Para descartar un efecto inespecíficos de estos agentes, probamos su efecto en ovocitos que no expresaban heterológamente ningún subtipo de nAChRs (ovocitos no inyectados). Como se muestra en la figura 22.A., ninguno de los agonistas colinérgicos utilizados evocó una respuesta medible (n=3, 2 donadores) en ovocitos no inyectados, indicando que nuestras condiciones experimentales eran las adecuadas para llevar a cabo el presente estudio y que las respuestas anteriormente registradas no estaban relacionadas con la activación de receptores muscarínicos nativos de la membrana del ovocitos (Kusano y col., 1982). Por otro lado, la aplicación de ACh y oxo-M indujeron corrientes de entrada similares a aquellas descritas en la figura 20.A., mientras que la muscarina y la metacolina no produjeron respuestas medibles a través del subtipo de receptor en estudio (n=6, 2 donadores).

En la figura 22.C se muestra un protocolo experimental similar al mostrado en la figura 20.A., donde aplicamos un pulso control de ACh 100 μ M (5 s) seguido de pulsos de oxo-M 300 μ M (5 s, aplicados a intervalos de 120 s) en ausencia y en presencia de los antagonistas colinérgicos atropina y mecamilamina. El correspondiente antagonista se aplicó durante 2 minutos antes y durante el pulso de oxo-M. Como se observa en la figura, la perfusión del ovocito con atropina 10 nM no afectó la amplitud de la corriente inducida por la oxo-M; sin embargo, la aplicación de mecamilamina 10 μ M bloqueó completamente la respuesta inducida por oxo-M. El bloqueo por mecamilamina fue reversible, observándose la recuperación gradual de la corriente control con el lavado (no mostrado).

A

 $\alpha 3\beta 4$ humano

B



C

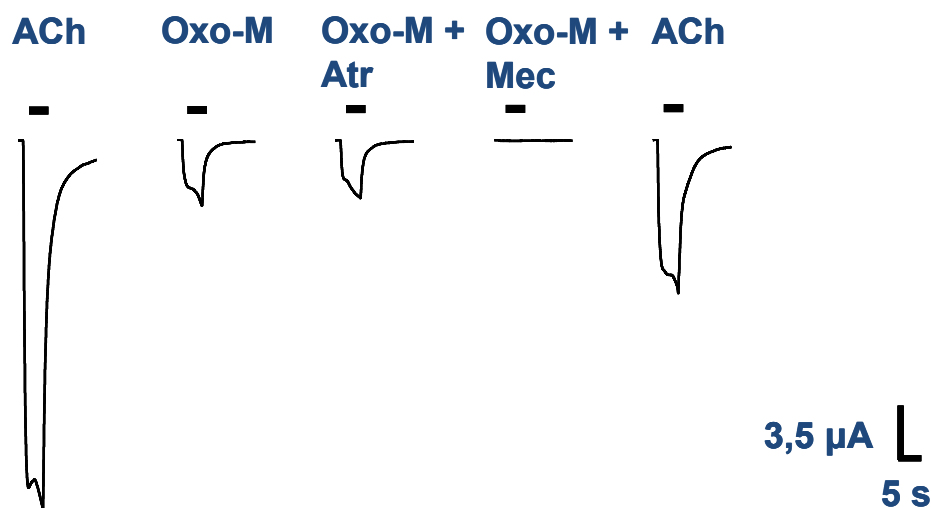


Fig. 22. El efecto de oxo-M sobre nAChR $\alpha 3\beta 4$ tiene naturaleza nicotínica. Ovocitos sin expresión heteróloga de nAChRs (figura A) y con expresión de nAChR $\alpha 3\beta 4$ humano (figura B) se estimularon con pulsos de 5 s de ACh (100 μ M), oxo-M (1 mM), muscarina (100 μ M) y metacolina (300 μ M), aplicados a intervalos de 2 min. El potencial de membrana se fijó en -70 mV. La ausencia de respuestas en los primeros ovocitos nos indica que nuestras condiciones experimentales eran las adecuadas para llevar a cabo este tipo de experimentos. La figura C nos muestra la aplicación de oxo-M en ausencia y presencia de los antagonistas colinérgicos atropina y mecamilamina en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ humanos. Los antagonistas se perfundieron 2 minutos antes y durante del pulso de oxo-M.

4.1.2.-Agonismo parcial de la oxo-M en nAChR $\alpha 7$ expresado heterológamente en ovocitos de *Xenopus*.

El efecto de la oxo-M se examinó además sobre los receptores $\alpha 7$, uno de los subtipos de nAChR más abundantes en el cerebro de mamíferos (Gotti *y col.*, 2006) y también presente en las células cromafines de distintas especies, entre ellas la bovina (García-Guzmán *y col.*, 1995; Mousavi *y col.*, 2001; Sala *y col.*, 2008). La aplicación de pulsos de 5 s de ACh (1 mM) u oxo-M (de 3 μ M a 1 mM) originaron corrientes de entrada en ovocitos que expresaban el nAChR $\alpha 7$ humano. La figura 23.A., muestra un registro original representativo de las corrientes generadas por 1 mM de ACh y por 1 mM de oxo-M. Como puede observarse, las corrientes inducidas por ACh se caracterizaron por una rápida cinética de activación y desensibilización ($\tau_{off} = 345.22 \pm 14.81$ ms) y como en el mismo ovocito la aplicación de pulsos de oxo-M indujeron corrientes de entrada con unas características cinéticas distintas a las corrientes generadas por la ACh, mostrando un marcado retraso en su desensibilización ($\tau_{off} = 3415.96 \pm 551.27$ ms; $p < 0.001$; t-Test, $n=4$).

La figura 23.B. muestra las curvas concentración-respuesta correspondientes a ACh y a oxo-M en ovocitos que expresan el receptor $\alpha 7$ humano ($n=7$, 3 donadores y $n=4$, 3 donadores, respectivamente). Los valores de CE_{50} obtenidos para la ACh y oxo-M fueron 145.96 ± 56.87 μ M y 105.57 ± 22.56 μ M, respectivamente, aunque no se encontraron diferencias significativas entre ambos valores, indicando una similar potencia de la oxo-M y la ACh en este subtipo de receptor. El pico máximo de la corriente evocada por oxo-M fue de un 45.48 ± 1.58 % respecto de la corriente máxima inducida por ACh (1 mM), lo que muestra que la oxo-M es menos eficaz que la ACh en este tipo de ovocitos ($p < 0.05$; t-Test, $n=4$). Todos los datos de este apartado se hallan resumidos en la tabla 7.

De forma similar al estudio realizado sobre el receptor $\alpha 3\beta 4$, también se estudió el efecto de la molécula oxo-M sobre ovocitos inyectados con la subunidad $\alpha 7$ bovina. La figura 24.A. muestra corrientes originales de un experimento representativo, generadas por diferentes concentraciones de oxo-M en ovocitos $\alpha 7$ bovinos. Observamos, al igual que en el caso anterior, como la oxo-M induce corrientes con una cinética distinta a las evocadas por ACh, produciéndose un retraso en la desensibilización de las corrientes. La figura 24.B. muestra las curvas concentración-respuesta a ACh y a oxo-M correspondientes a esta población de ovocitos, que mostraron una similar sensibilidad a ACh (CE_{50} 129.81 ± 35.22 μ M, $n=6$, 3 donadores) y a oxo-M (76.44 ± 8.27 μ M, $n=8$, 3 donadores) (no existen diferencias estadísticamente

significativas). Como ocurría en los ovocitos que expresaban el receptor $\alpha 7$ humano, oxo-M se comportó como un agonista parcial del receptor bovino, activando corrientes de entrada de un $72,37 \pm 5,46\%$ relativas a la corriente máxima generada por ACh 1 mM, aunque en este caso se comportó como un ligando bastante más eficaz que en el caso humano ($p < 0,001$; t-Test).

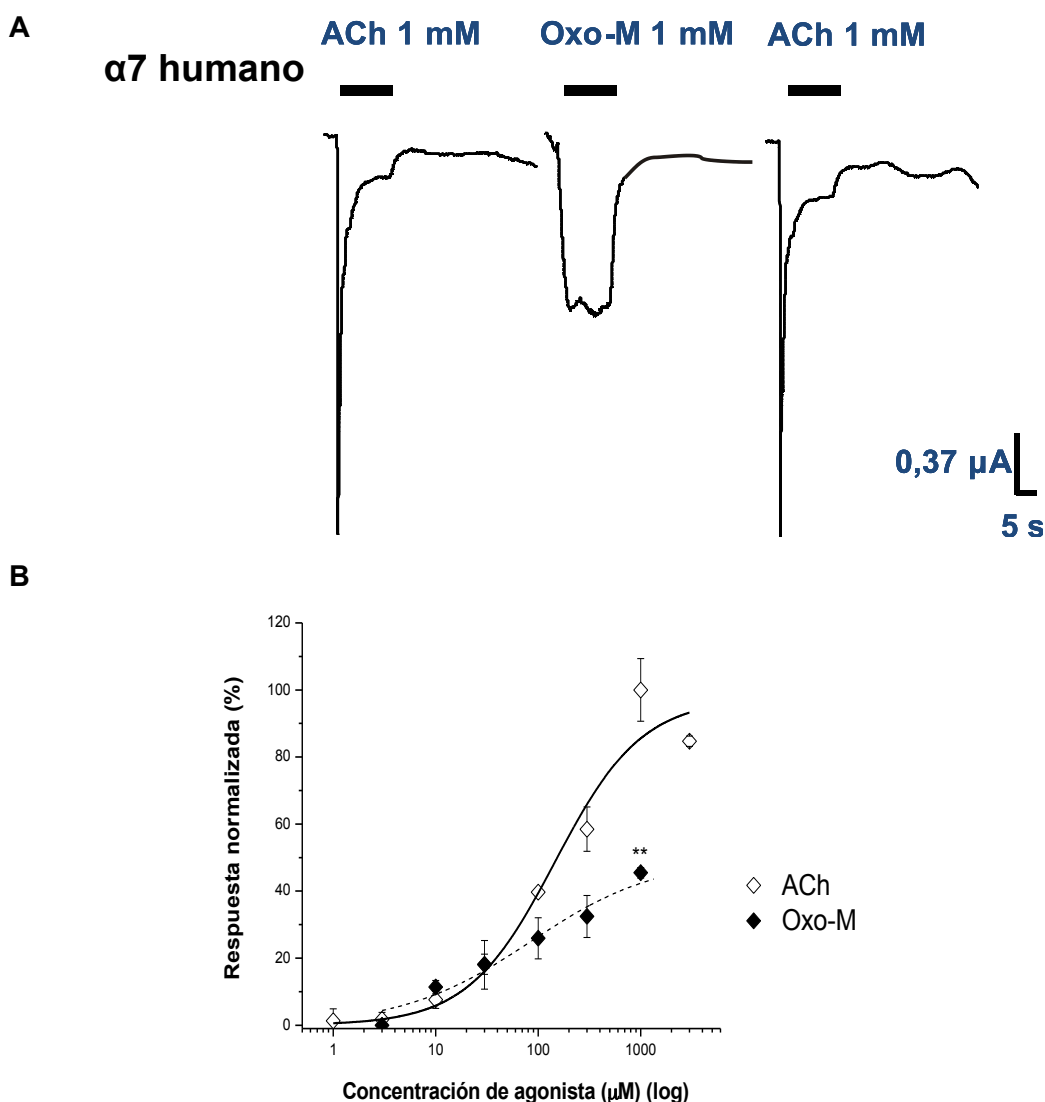
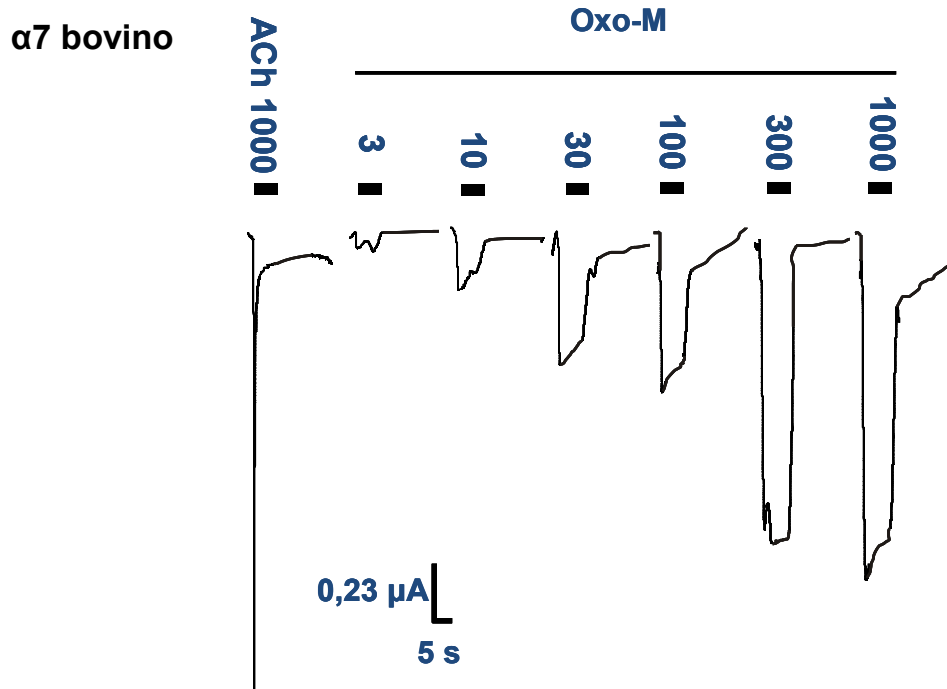


Fig. 23. Efecto de oxo-M sobre nAChR $\alpha 7$ humanos expresados en ovocitos de *Xenopus*. La figura A muestra registros representativos de corrientes internas originadas tras la aplicación de ACh (1 mM) y oxo-M (1 mM) en ovocitos que expresan receptores nicotínicos $\alpha 7$ humanos. Los ovocitos se mantuvieron con un potencial de membrana de -70 mV, y se estimularon mediante pulsos de agonista de 5 s de duración (ver barra horizontal superior al trazo), aplicados a intervalos de 2 min. La figura B muestra las curvas concentración-respuesta construidas a partir de las corrientes evocadas por la ACh y oxo-M en ovocitos $\alpha 7$ humanos. Las respuestas se expresan como el porcentaje de la corriente originada por ACh 1 mM. Los datos resultan de la media \pm E.M.S de las corrientes evocadas por ACh y oxo-M en 7 y 4 ovocitos respectivamente, procedentes de al menos 3 donadores diferentes. ** $p < 0.01$ cuando comparamos las corrientes generadas por ACh 1 mM y oxo-M 1 mM.

A



B

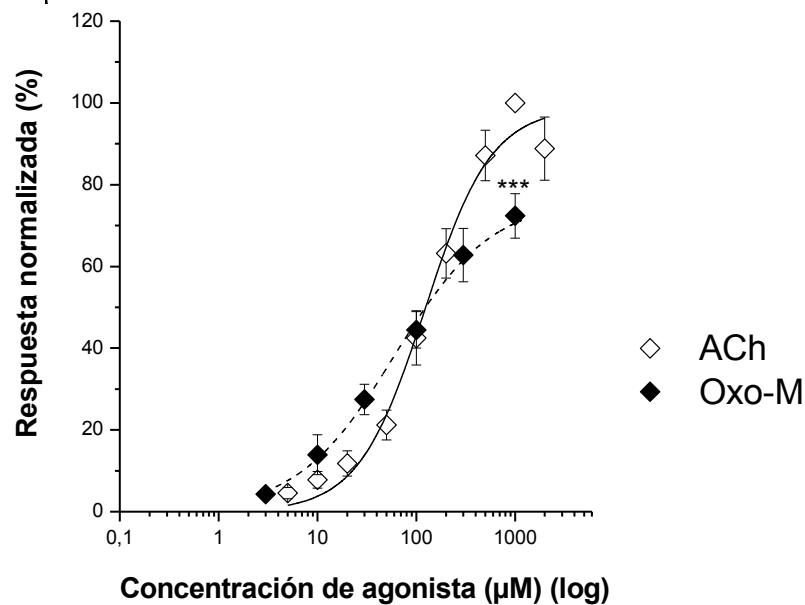


Fig. 24. La aplicación de oxo-M en ovocitos que expresan nAChR $\alpha 7$ bovinos originó corrientes de entrada. La figura A muestra registros representativos de corrientes de entrada evocadas por diferentes concentraciones de oxo-M (desde 3 a 1000 μM) en ovocitos que expresan receptores nicotínicos $\alpha 7$ bovinos. Los ovocitos mantenidos con un potencial de membrana de -70 mV se estimularon con pulsos de agonista de 5 s de duración, como inidca la barra horizontal superior al trazo, aplicados a intervalos de 2 min. La figura B muestra las curvas concentración-respuesta construidas a partir de las corrientes generadas por la aplicación de ACh y oxo-M en ovocitos $\alpha 7$ bovinos. Las respuestas se expresan como el porcentaje de la corriente originada por ACh 1 mM. Los datos resultan de la media \pm E.M.S de las corrientes producidas por ACh y oxo-M en 6 y 8 ovocitos respectivamente. Procedentes de al menos 3 donadores diferentes. ***p<0.001 cuando comparamos las corrientes generadas por ACh 1 mM y oxo-M 1 mM.

Para una caracterización más profunda de la naturaleza nicotínica de las respuestas evocadas por la oxo-M en los ovocitos $\alpha 7$, se estudió el efecto del modulador alostérico positivo (MAP) del nAChR $\alpha 7$, el PNU 120596 (Hurst y *col.*, 2005), sobre las corrientes inducidas por ACh (I_{ACh}) y por oxo-M (I_{oxo-M}) en el subtipo humano. Se aplicaron pulsos de ACh (100 μ M, 5 s) en ausencia (control) y en presencia de PNU 120596 1 μ M, que se perfundió durante 2 minutos antes y durante el pulso de ACh. En la parte superior de la figura 7.A. se muestran dos corrientes representativas resultado de la aplicación de ACh en ausencia (control; trazo izquierdo) y en presencia de PNU 120596 1 μ M (trazo derecho). A continuación se muestra en la misma figura los trazos de corrientes obtenidas en respuesta a pulsos de oxo-M (300 μ M), aplicados en ausencia y en presencia de PNU120596 (n=5, 2 donadores). Nótese que cuando el PNU 120596 fue pre- y co-aplicado, se observó un marcado incremento de las corrientes inducidas tanto por ACh como por oxo-M, junto con un marcado retraso de la inactivación de la corriente, típico efecto de este MAP (Hurst y *col.*, 2005). La potenciación de las corrientes por acción del PNU 120596 fue de 24 veces para las I_{ACh} y de 22 veces para las I_{Oxo-M} (no se hallaron diferencias significativas en la potenciación del efecto de ambos agonistas) (Figura 7.B.). Para descartar un efecto inespecífico de este compuesto sobre ovocitos $\alpha 7$, se utilizó el mismo protocolo experimental pero aplicando pulsos de los agonistas muscarínicos muscarina y metacolina. Como muestra la parte inferior de la figura 7.A., ni la aplicación de muscarina (100 μ M) (n=4) ni la de metacolina (300 μ M) en presencia o en ausencia de PNU 120596 evocaron respuestas medibles en ovocitos $\alpha 7$ (n=3, 2 donadores).

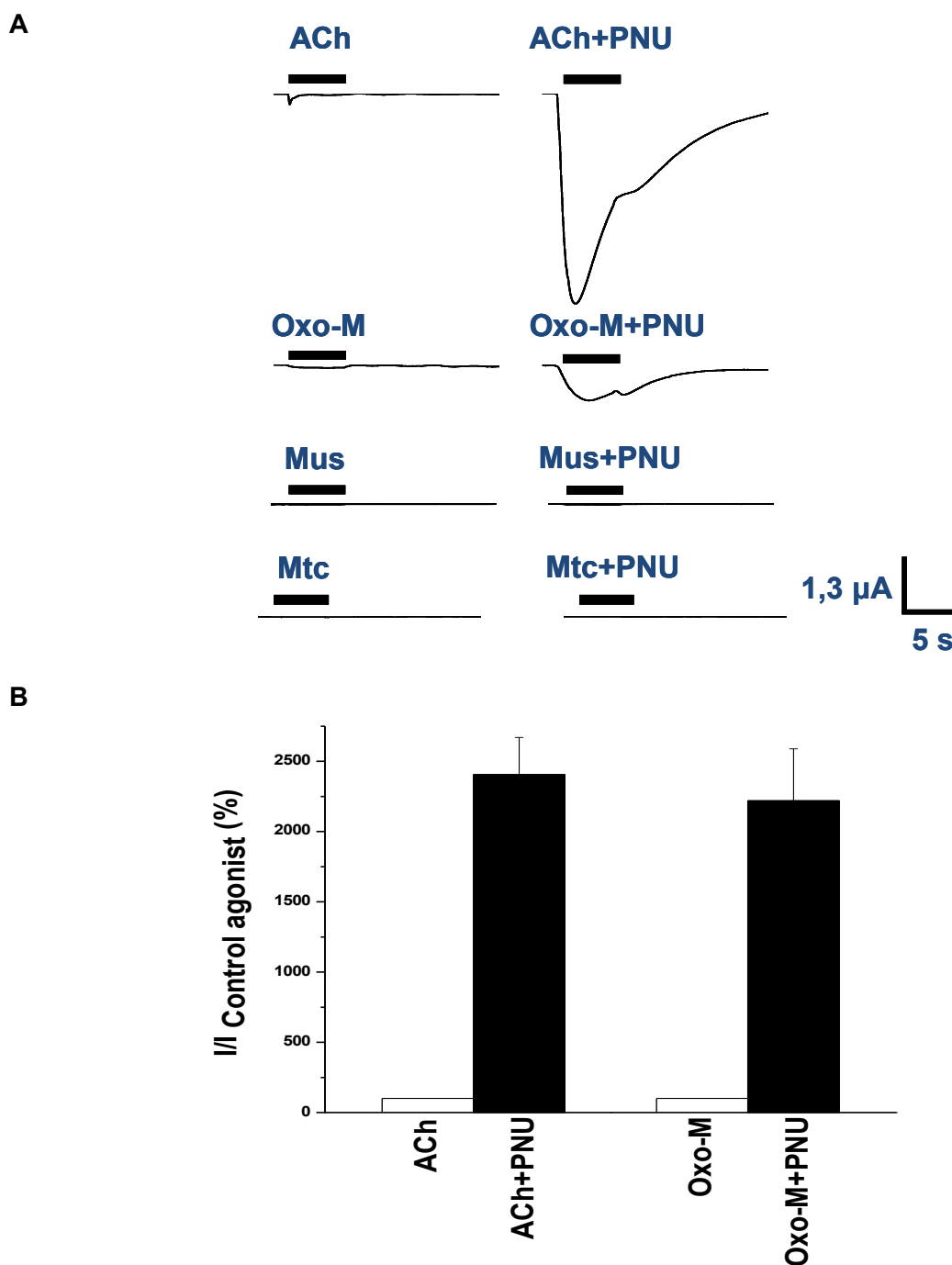


Fig. 25. El efecto de oxo-M en nAChR $\alpha 7$ tiene naturaleza nicotínica. La figura A muestra el efecto de la molécula PNU 120596 (1 μ M) en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresan el receptor nAChR $\alpha 7$ humano. La perfusión de los ovocitos $\alpha 7$ con PNU 120596 produjo una marcada potenciación de la corriente nicotínica evocada por ACh (100 μ M) y oxo-M (300 μ M) en 5 ovocitos procedentes de 2 donadores (figura B) pero no cuando muscarina y metacolina se aplicaron sobre estos ovocitos (n=4 y 3, 2 donadores respectivamente).

4.1.3.-Efecto de oxo-M sobre nAChR $\alpha 4\beta 2$ humano.

El efecto de oxo-M se examinó también sobre el principal subtipo de nAChRs en el cerebro de mamíferos, el receptor $\alpha 4\beta 2$ (Gaimarri y *col.*, 2007), heterológamente expresado en ovocitos de *Xenopus*. La figura 26.A. muestra un experimento representativo donde la aplicación de ACh cada 5 segundos a intervalos de 2 minutos evoca corrientes de entrada caracterizadas por una fase de activación rápida seguida por una inactivación de la corriente más lenta ($\tau_{off} = 2680,78 \pm 176,51$ ms), como ya se ha descrito previamente para este receptor en estas condiciones experimentales (Chavez-Noriega y *col.*, 1997). Cuando se aplicó oxo-M 300 μ M a estos ovocitos, esta molécula no indujo ninguna corriente recuperándose la corriente control de ACh tras el lavado. La figura 26.B. muestra la curva concentración-respuesta a ACh y las “respuestas” obtenidas tras la aplicación de diferentes concentraciones de oxo-M (30 μ M a 10 mM) (n=6, 3 donadores en cada caso). El valor de CE_{50} obtenido para la ACh fue de $35,98 \pm 0,13$ μ M. Ninguna de las concentraciones de oxo-M estudiadas indujo respuestas medibles. Todos los datos de este apartado se encuentran resumidos en la Tabla 7.

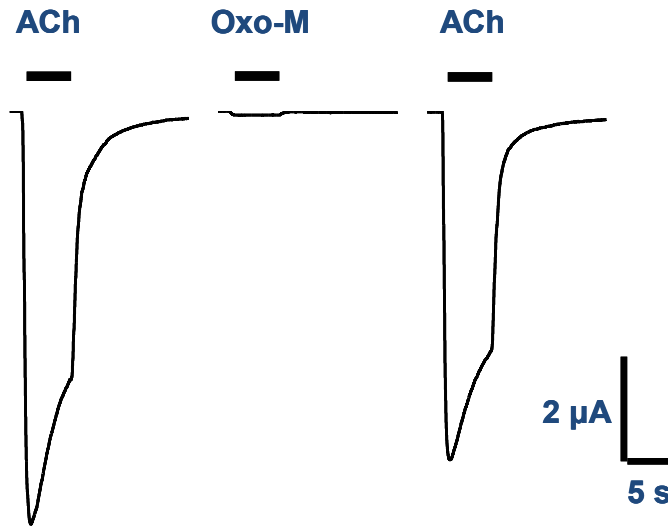
TABLA 7. Comparación de la potencia y eficacia de ACh y oxo-M en hnAChRs recombinantes

| Agonistas | h $\alpha 4\beta 2$ | h $\alpha 3\beta 4$ | h $\alpha 7$ | b $\alpha 3\beta 4$ | b $\alpha 7$ |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|--------------------|
| ACh (n) | 6 | 3 | 7 | 5 | 6 |
| CE_{50} (μ M) | $35,98 \pm 0,13$ | $92,95 \pm 13,56$ | $145,96 \pm 56,87$ | $171,68 \pm 10,31$ | $129,81 \pm 35,22$ |
| $I_{1mM ACh}$ (μ A) | $34,27 \pm 11,85$ | $125,91 \pm 15,75$ | $2,96 \pm 0,8$ | $4,22 \pm 0,46$ | $5,57 \pm 1,22$ |
| τ_{off} (ms), 100 μ M ACh | $2680,78 \pm 176,51$ | $1229,64 \pm 56,62$ | $345,22 \pm 14,81$ | n.d. | n.d. |
| Oxo-M (n) | 6 | 8 | 4 | 8 | 8 |
| CE_{50} (μ M) | n.d. | $269,64 \pm 50,98$ | $105,57 \pm 22,56$ | $234,40 \pm 47,30$ | $76,44 \pm 8,27$ |
| $I_{max}/I_{1mM ACh}$ (%) | $0,73 \pm 0,03$ | $11,01 \pm 0,97$ | $45,48 \pm 1,58$ | $34,7 \pm 2,68$ | $72,37 \pm 5,46$ |
| τ_{off} (ms), 300 μ M Oxo-M | n.d. | $1032,82 \pm 36,98$ | $3415,96 \pm 551,27^{***}$ | n.d. | n.d. |

La potencia (CE_{50}), la eficacia ($I_{1mM ACh}$ y $I_{max}/I_{1mM ACh}$) y τ_{off} se expresan como la media aritmética \pm E.M.S; (n) indica el número de ovocitos incluidos en el análisis, procedentes de al menos 3 donadores diferentes. *** $P < 0.001$ cuando comparamos con τ_{off} obtenida cuando la ACh actúa como agonista.

A

$\alpha 4 \beta 2$ humano



B

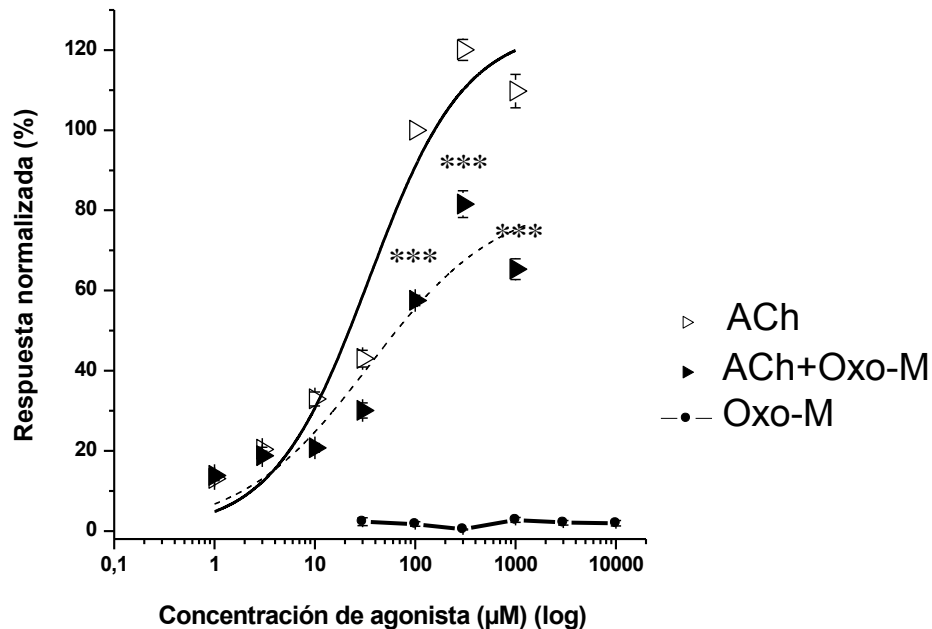
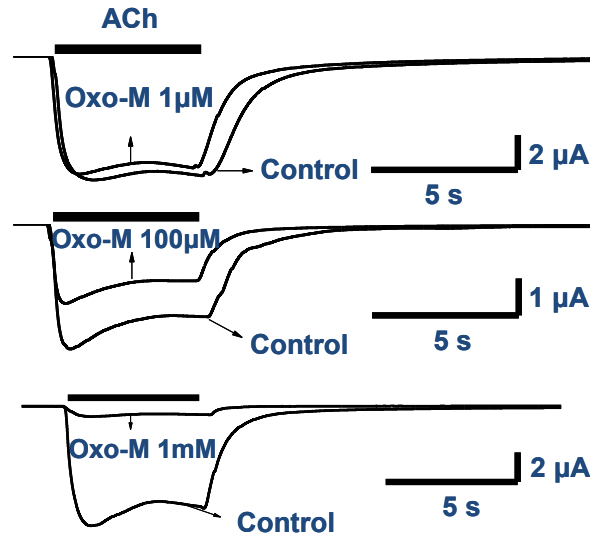


Fig. 26. La aplicación de oxo-M sobre ovocitos que expresaban nAChR $\alpha 4 \beta 2$ humanos no indujo corrientes de entrada. La figura A muestra registros representativos de corrientes de entrada originadas por ACh (100 μ M) y oxo-M (300 μ M) en ovocitos que expresan receptores nicotínicos $\alpha 4 \beta 2$ humanos. Los ovocitos se mantuvieron con un potencial de membrana de -70 mV y se estimularon con pulsos de agonista de 5 s de duración como indica la barra horizontal superior a los trazos, a intervalos de 2 min. La figura B muestra las curvas concentración-respuesta construidas a partir de las corrientes activadas por ACh, ACh en presencia de oxo-M 300 μ M y oxo-M en ovocitos $\alpha 4 \beta 2$ humanos. Las respuestas se expresan como el porcentaje de la corriente evocada por ACh 100 μ M. Los datos resultan de la media \pm E.M.S de las corrientes originadas por ACh, ACh en presencia de oxo-M y oxo-M en 6, 7 y 6 ovocitos respetivamente, procedentes al menos de 3 donadores diferentes. *** $P < 0.001$, cuando comparamos las corrientes evocadas por ACh en presencia de oxo-M con las corrientes obtenidas en ausencia de la molécula de estudio.

Aunque la oxo-M fue incapaz de inducir corrientes a través de los nAChR $\alpha 4\beta 2$ humanos, bloqueó las corrientes inducidas por ACh en este subtipo de receptor (pulsos de 5 segundos a una concentración de 100 μ M). La figura 27.A. muestra tres trazos originales representativos de I_{ACh} obtenidos en ovocitos expuestos a tres concentraciones crecientes de oxo-M. Obsérvese como la oxo-M redujo la amplitud de la corriente en una forma concentración-dependiente; nótese también que la corriente se redujo de una forma paralela con respecto a la corriente control, lo que sugiere que la oxo-M no afecta a la cinética de las I_{ACh} . La figura 27.B. muestra la curva concentración-respuesta para la inhibición por oxo-M de la corriente generada por ACh 100 μ M ($I_{100 \mu M ACh}$) (n=4, 2 donadores). La oxo-M inhibió la corriente con una CI_{50} de $191 \pm 0,20 \mu$ M, siendo el máximo bloqueo de la corriente de ACh ejercido por la concentración de 1 mM de la molécula. El coeficiente de Hill de la curva concentración-respuesta fue inferior a la unidad (nH=0,69), sugiriendo la existencia múltiples clases de sitio de unión por receptor o la existencia de cooperatividad negativa.

Para caracterizar de una forma más profunda el mecanismo de este bloqueo, en primer lugar se examinó la naturaleza competitiva o no-competitiva de la inhibición de las I_{ACh} por oxo-M en ovocitos $\alpha 4\beta 2$. Para llevar a cabo esta determinación, se aplicaron concentraciones crecientes de ACh (de 1 μ M a 3 mM) en cada ovocito para crear la correspondiente curva concentración-respuesta en presencia de oxo-M 300 μ M. Si el bloqueo fuese competitivo, la inhibición de las I_{ACh} por oxo-M debería ser cada vez menor a mayores concentraciones de ACh utilizadas. Este es el caso del bloqueador nicotínico dihidro- β -eritroidina (Bertrand y col., 1992). Sin embargo, si el bloqueo fuera no-competitivo, la inhibición de las I_{ACh} por oxo-M debería ser similar en todas las concentraciones de ACh utilizadas, como ocurre en el caso del hexametONIO (Bertrand y col., 1992). La figura 26.B. muestra las curvas concentración-respuesta para ACh, llevadas a cabo en ausencia (control) y en presencia de oxo-M (n=7, 3 donadores). Aunque la oxo-M parece desplazar la curva de ACh hacia la derecha en una forma no-paralela, no modificó significativamente el valor de CE_{50} para la ACh en el nAChR $\alpha 4\beta 2$ humano expresado heterológamente; la curva concentración-respuesta a ACh realizada en presencia de oxo-M 300 μ M originó un valor de CE_{50} de $36,39 \pm 0,28 \mu$ M, que es cercano al valor obtenido en ausencia de oxo-M ($35,98 \pm 0,13 \mu$ M). La magnitud de la corriente máxima evocada por ACh no se alcanzó incluso cuando se aplicaron concentraciones mayores a 1 mM de ACh, sugiriendo un mecanismo de bloqueo no-competitivo de la oxo-M en este subtipo de receptor.

A



B

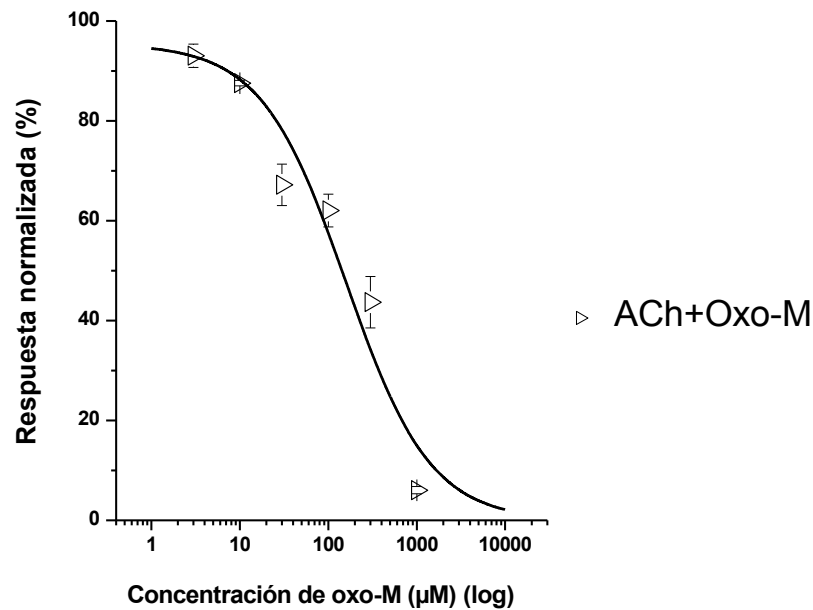
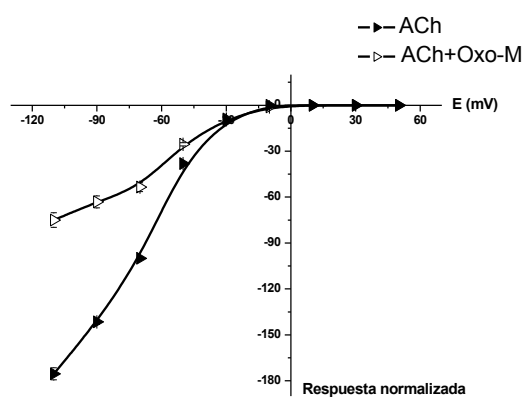


Fig. 27. El bloqueo de oxo-M sobre la I_{ACh} en ovocitos $\alpha 4\beta 2$ es concentración-dependiente. La figura A muestra ejemplos de trazos originales obtenidos de tres ovocitos diferentes. Las corrientes resultan de la aplicación de una concentración constante de ACh (100 μ M) y concentraciones crecientes de oxo-M (3, 100 μ M y 1 mM) en ovocitos $\alpha 4\beta 2$ cuyo potencial de membrana se fijó en -70 mV. Una concentración de oxo-M se estudió en cada ovocito. Los pulsos de ACh (5 s) se aplicaron a intervalos de 2 min. oxo-M se perfundió sobre los ovocitos durante 2 min antes y durante la aplicación del pulso de ACh. La figura B muestra la curva concentración-respuesta para la inhibición del pico de I_{ACh} (ordenada) por concentraciones crecientes de oxo-M (abscisa). La curva se construyó con datos (media \pm E.M.S) procedentes de 4 ovocitos obtenidos de al menos 2 donadores diferentes.

A continuación, para una mayor caracterización del mecanismo de bloqueo de la oxo-M se estudió si éste exhibía voltaje-dependencia. Así, en ausencia y en presencia de oxo-M se aplicaron pulsos de ACh sobre ovocitos $\alpha 4\beta 2$ cuyo potencial de membrana se fijó entre valores de -110 mV a +70 mV, a incrementos de 20 mV. La figura 28.A. muestra la relación intensidad-voltaje que revela un mecanismo de bloqueo voltaje-dependiente: la fracción de corriente inhibida es mayor a valores de potencial de membrana hiperpolarizados. En la figura 28.B. se muestra el grado de bloqueo de la corriente a ACh que produce la presencia de oxo-M 300 μ M a diferentes voltajes (n=8, 3 donadores). Este efecto se puede relacionar con un mecanismo de bloqueo de canal abierto (Gurney y col., 1984; Paoletti y col., 1997; Buisson y col., 2001).

A



B

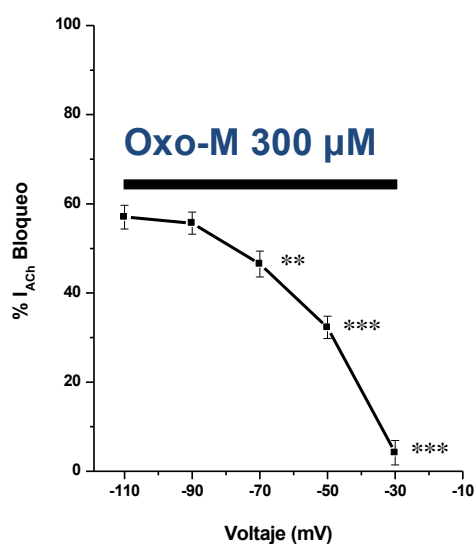


Fig. 28. El bloqueo de la I_{ACh} por oxo-M en ovocitos $\alpha 4\beta 2$ es voltaje-dependiente. La figura A muestra las curvas voltaje-intensidad de las corrientes control, I_{ACh} y las I_{ACh} obtenidas en presencia de oxo-M 300, representadas como el porcentaje de la respuesta obtenida por la aplicación de ACh. El bloqueo de la I_{ACh} por oxo-M se calculó a partir de la curva I-V y se expresó como el % del bloqueo de la I_{max} para cada voltaje (% bloqueo, ordenada, a diferentes voltajes, abscisa, figura B). Los datos expresados resultan de la media \pm E.M.S y proceden de 8 ovocitos de al menos 3 donadores diferentes. *** $P < 0.001$ y ** $P < 0.01$, cuando comparamos con la corriente bloqueada a -110 mV.

Para determinar si efectivamente la oxo-M se comporta como un bloqueador de canal abierto (BCA) se analizó otra de las características de este tipo de inhibidores: la uso-dependencia de su efecto, entendida como el incremento de la fracción de corriente inhibida en presencia de una concentración fija de BCA (Gurney y *col.*, 1984). Tal y como se ilustra en la figura 29.A. y 29.B., la pre- y co-aplicación de oxo-M 300 μ M indujo una progresiva inhibición de las corrientes evocadas por pulsos repetidos de ACh (100 μ M, pulsos de 5 segundos a intervalos de 2 minutos), tanto si éstos se aplicaron 2 minutos o 10 minutos antes del segundo pulso de agonista ($n=7$, 2 donadores en cada caso). Como puede observarse, el grado de bloqueo de las I_{ACh} fue independiente al tiempo de exposición a oxo-M y fue resultado del número de aperturas del canal por estimulación del agonista (ver figuras 11.C. y 11.D.). La recuperación parcial de la corriente evocada por ACh se observó tras el lavado.

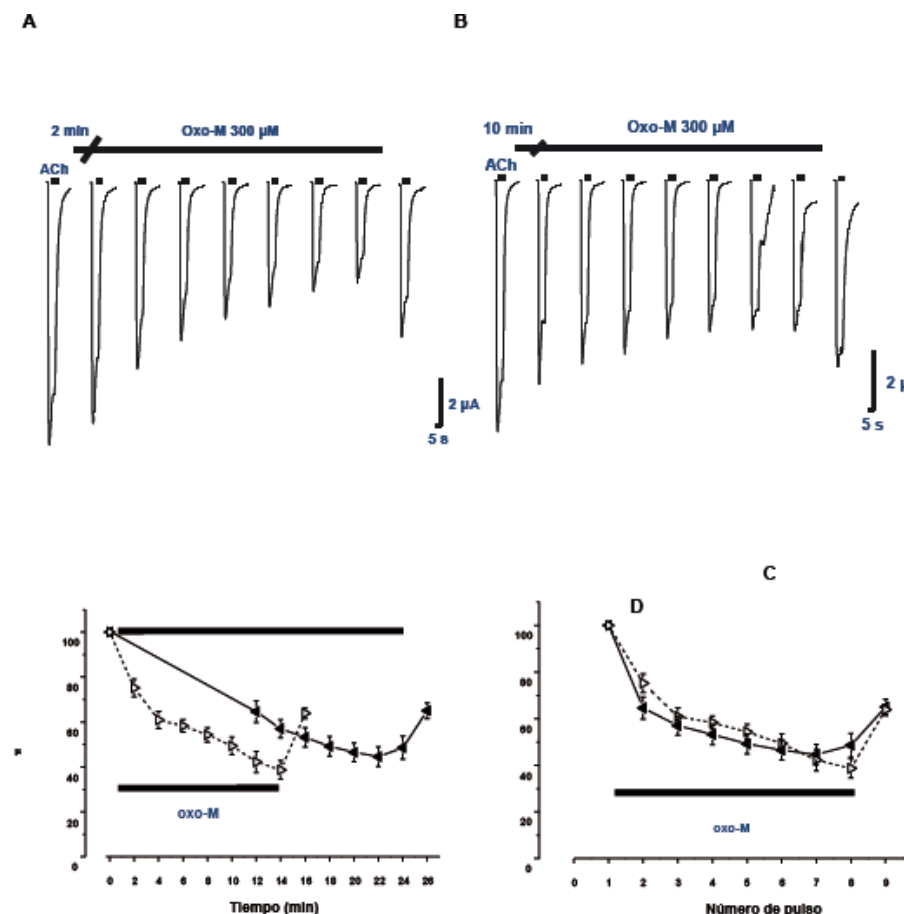


Fig. 29. El bloqueo de la I_{ACh} por oxo-M en ovocitos $\alpha 4\beta 2$ oocytes es uso-dependiente. Las figuras A y B muestran el bloqueo progresivo de la corriente original obtenida en ovocitos que expresan receptores $\alpha 4\beta 2$ humanos estimulados con ACh 100 μ M y perfundidos con oxo-M 300 μ M justo después del primer pulso o 10 min después del mismo. Los pulsos de ACh (5 s) se aplicaron a intervalos de 2 min. Las figuras C y D muestran las respuestas expresadas como el porcentaje de corriente evocada por ACh 100 μ M respecto del tiempo y del número de pulso cuando oxo-M es perfundido 2 o 10 min antes del segundo pulso de agonista. Las gráficas se construyeron con los datos (media \pm E.M.S) procedentes de 7 ovocitos en cada caso, de al menos 2 donadores diferentes. No se encontraron diferencias significativas entre los dos casos

4.1.4. Modelado Molecular.

En un intento de explicar como tiene lugar la unión de la molécula oxo-M a los nAChRs, se llevó a cabo un estudio de modelado molecular utilizando el programa QUANTA/CHARMm. Se simuló la unión por ordenador o docking de la molécula de oxo-M a los modelos tridimensionales de los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$, y a la estructura de rayos-X del complejo AChBP-epibatidina de *Aplysia*, tras haber sido extraída esta última molécula. Se utilizó la AChBP en lugar de un modelo del receptor nicotínico $\alpha 7$ en un intento por simular la interacción del ligando en estudio con este receptor. Los complejos resultantes se minimizaron y se muestran en las figuras 12, 13 y 14. El “docking” de oxo-M al receptor $\alpha 7$ indica que se formaría un puente de hidrógeno. Este puente se produce entre el grupo carbonilo y el grupo amino perteneciente a la Tyr195 del receptor $\alpha 7$. La amina cuaternaria de la molécula de oxo-M se localiza en la proximidad de la Tyr55 y en consecuencia existiría una fuerte interacción catión- π con la proteína (ver figura 30).

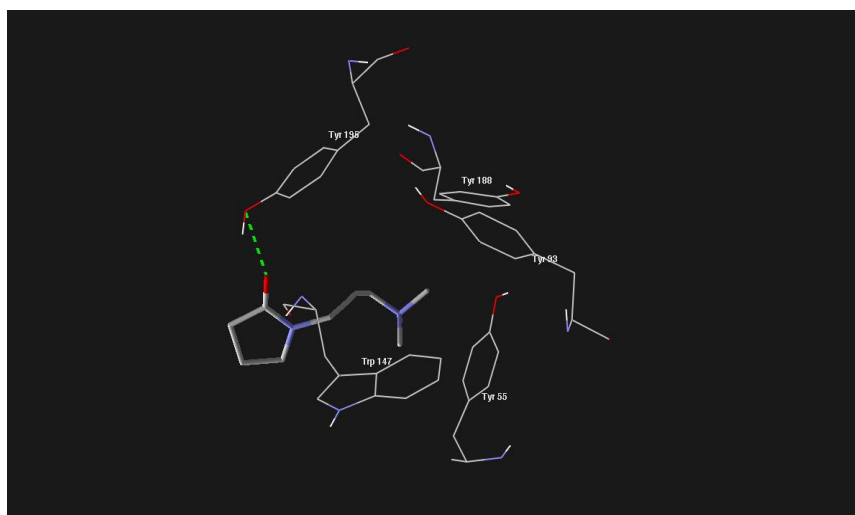


Fig. 30. Oxotremorina M unida al receptor $\alpha 7$: todos los hidrógenos, excepto los polares se ha omitido para una mayor claridad.

El anclaje de oxo-M al receptor $\alpha 4\beta 2$ muestra que este ligando formaría un puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo NH del Asp134 perteneciente a la subunidad $\beta 2$ y que participa en el sitio de unión al ligando. Además, el voluminoso grupo amino cuaternario de oxo-M se localiza dentro del bolsillo hidrofóbico formado por los aminoácidos aromáticos Tyr230, Tyr233, Trp182 y Trp82, pudiendo existir en consecuencia interacciones catión- π y de tipo hidrofóbico con la proteína (figura 31).

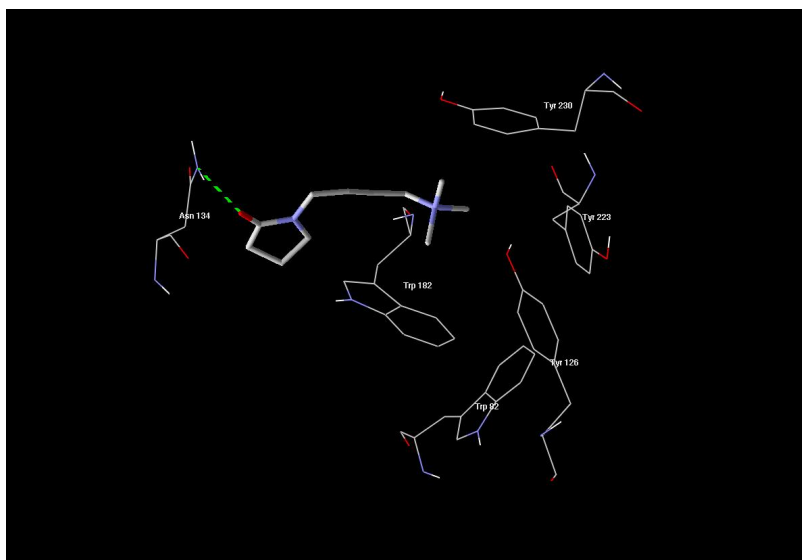


Fig. 31. Oxotremorina M unida al receptor $\alpha 4\beta 2$; todos los hidrógenos, excepto los polares se ha omitido para una mayor claridad.

El anclaje de oxo-M con el nAChR $\alpha 3\beta 4$ muestra como la amina cuaternaria de esta molécula se localiza en un lugar similar a donde se situaría en el receptor $\alpha 4\beta 2$. En este caso, la oxo-M forma dos puentes de hidrógeno: uno de ellos se originaría entre el grupo carbonilo y el grupo amino de la Glu117 de la subunidad $\beta 4$, y el otro se produciría entre el nitrógeno pirrolidino y el grupo amino protonado de la Lys57 perteneciente a la subunidad $\alpha 3$. El grupo trimetil amonio (amina cuaternaria) se localiza dentro del bolsillo hidrofóbico que está formado por los aminoácidos aromáticos Tyr195, Trp147, Trp55, por lo que existirían interacciones catión- π y de tipo hidrofóbico con la proteína (figura 32).

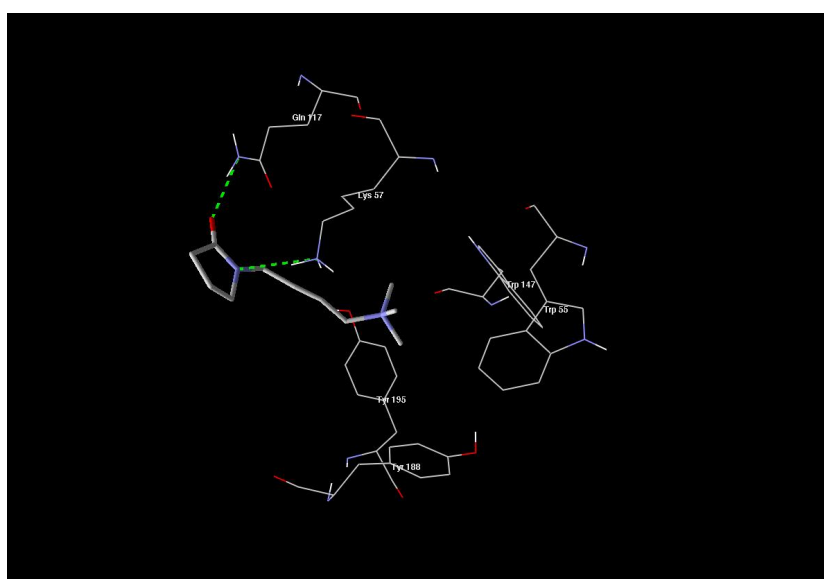


Fig. 32. Oxotremorina M unida al receptor $\alpha 3\beta 4$; todos los hidrógenos, excepto los polares se ha omitido para una mayor claridad.

Como ya describimos en apartados anteriores, los agonistas muscarínicos metacolina y muscarina no indujeron ninguna respuesta en los receptores estudiados. Este comportamiento se puede explicar en base a las diferencias estructurales entre la molécula de oxo-M y las de estos ligandos muscarínicos. En la figura 33 se puede ver como la oxo-M adopta una estructura planar, mientras que la metacolina y la muscarina adoptan una estructura tridimensional lo que dificulta su accesibilidad al sitio de unión del ligando del nAChR.

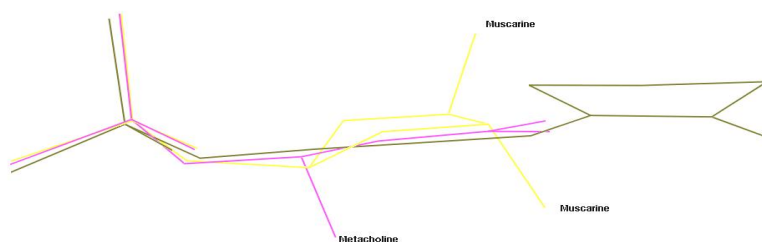
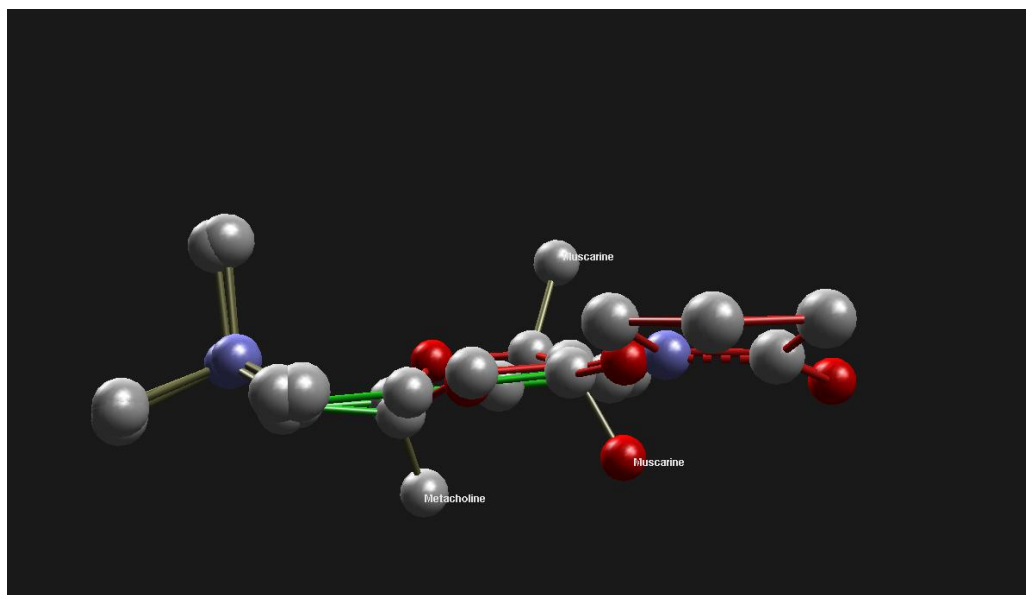


Fig. 33. Superposición de las moléculas de oxotremorina M, metacolina y muscarina.

4.2. ESTUDIO DE DOS ESTEQUIOMETRÍAS ALTERNATIVAS PARA EL nAChR $\alpha3\beta4$

Una de las aproximaciones más utilizadas para la caracterización de los receptores nicotínicos musculares ha sido su expresión en sistemas heterólogos donde se ha demostrado que los canales recombinantes resultantes exhiben unas propiedades similares a los canales nativos presentes en la unión neuro-muscular. Además, se ha observado que estas propiedades no difieren en el empleo del sistema de expresión, por lo que se han podido usar indistintamente en su estudio los ovocitos de *Xenopus* y las líneas celulares de mamífero. Sin embargo, la situación difiere para otros tipos de receptores nicotínicos también muy abundantes en el SNP, los receptores ganglionares, entre los que se consideran los nAChRs presentes en las células cromafines.

Como ya hemos mencionado en apartados anteriores, las subunidades que contribuyen a estos receptores principalmente son $\alpha3$ y $\beta4$ (probablemente junto con las subunidades $\alpha5$ y $\alpha7$ en las células cromafines bovinas –(Criado y col., 1992; Rust y col., 1994; Garcia-Guzman y col., 1995; Campos-Caro y col., 1997; Wenger y col., 1997)–). Los receptores $\alpha3\beta4$ recombinantes expresados en ovocitos o en líneas celulares de mamífero se parecen a los canales nativos presentes en los ganglios autónomos (Covernton y col., 1994; Lewis y col., 1997) y en las células cromafines de distintas especies: rata (Wong y col., 1995; Meyer y col., 2001), bovino (Tachikawa y col., 2001; Free y col., 2003; Rojo y col., 2007) y humano (Chavez-Noriega y col., 1997; Stauderman y col., 1998; Boorman y col., 2003) en sus perfiles farmacológicos a distintos agonistas nicotínicos, pero son muy diferentes a ellos a nivel de canal único. Por ejemplo, en el caso de las células cromafines, los valores de conductancia de los receptores nativos registrados a potenciales de membrana negativos están en torno a 40 pS en la especie bovina (Fenwick y col., 1982; Maconochie y col., 1992; Nooney y col., 1992), alrededor de los 33 pS en cobaya (Inoue y col., 1991) y entre los 45 y 50 pS en PC12 (Ifune y col., 1992). Estos valores de conductancia son significativamente mayores que los observados en los receptores $\alpha3\beta4$ de rata, bovino y humano expresados en ovocitos, que abren con unas conductancias menores (en torno a 20-30 pS) y producen ráfagas más duraderas (Sivilotti y col., 1997; Rovira y col., 1998; Boorman y col., 2003). Sin embargo, cuando las subunidades $\alpha3$ y $\beta4$ se transfectan de forma estable en fibroblastos de ratón en una proporción 1:1, los registros de canal único en configuración fuera-fuera muestran aperturas de canales semejantes a las encontradas en ovocitos inyectados con estas subunidades además de una clase adicional que se asemeja al tipo nativo ganglionar (Lewis y col., 1997) y, en teoría, al presente en la célula cromafín, no encontrándose una explicación para este fenómeno.

Recientes trabajos acerca del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, subtipo mayoritario del SNC, muestran que éste puede existir en dos estequiometrías alternativas, con dos o tres copias para la subunidad $\alpha 4$ en el canal pentamérico (Nelson y col., 2003). Las dos formas para el receptor $\alpha 4\beta 2$ se distinguen porque el receptor con dos subunidades α se activa a bajas concentraciones de ACh, tiene una sensibilidad diferente a otros agonistas y las respuestas a concentraciones submáximas de ACh no se potencian en presencia de bajas concentraciones Zn^{2+} (Moroni y col., 2006; Moroni y col., 2008). La forma con dos subunidades α para este receptor, denominada de “alta sensibilidad”, predomina en ovocitos lo que ofrece la posibilidad de que las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos en los sistemas de expresión heteróloga y en la célula cromafín bovina pudieran explicarse si el receptor $\alpha 3\beta 4$ puede también existir en dos estequiometrías diferentes. A continuación, se presentan las evidencias que apoyan la hipótesis de que el receptor $\alpha 3\beta 4$ puede existir en dos estequiometrías distintas.

4.2.1. La inyección de proporciones diferentes de ARNm $\alpha 3:\beta 4$ en ovocitos produce receptores con distinta sensibilidad a ACh.

Distintos grupos han descrito que variaciones en la proporción $\alpha:\beta$ para el ARNm o ADNc de las subunidades que se inyectan para expresar el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ en ovocitos producen cambios en las propiedades del mismo debido a la modificación de la estequiometría de las subunidades presentes en el receptor (Papke y col., 1989; Luetje y col., 1991; Zwart y col., 1998; Moroni y col., 2006). Para comprobar si esto ocurre también para el receptor $\alpha 3\beta 4$, se estudió las respuestas a distintas concentraciones de ACh en ovocitos de *Xenopus* a los que se les inyectaron subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ humanas o bovinas en las proporciones 1:1, 1:9 y 9:1 (ver figuras 34.A y 35.A), construyéndose las correspondientes curvas concentración-respuesta para las corrientes totales generadas (figuras 34.B y 35.B). Las respuestas normalizadas a ACh se ajustaron bien a una ecuación sigmoideal de una componente en cada caso, indicando la presencia de un solo tipo de nAChR $\alpha 3\beta 4$ en cada población de ovocitos. El coeficiente de Hill resultante en cada curva fue cercano a 2 en el caso de los receptores humanos y de 1,4 para los receptores bovinos, excepto para los receptores expresados en ovocitos 9:1, cuyos nH fueron mayores ($3,04 \pm 0,33$ en humano; $2,31 \pm 0,15$ en bovino), como se resume en la tabla 8.

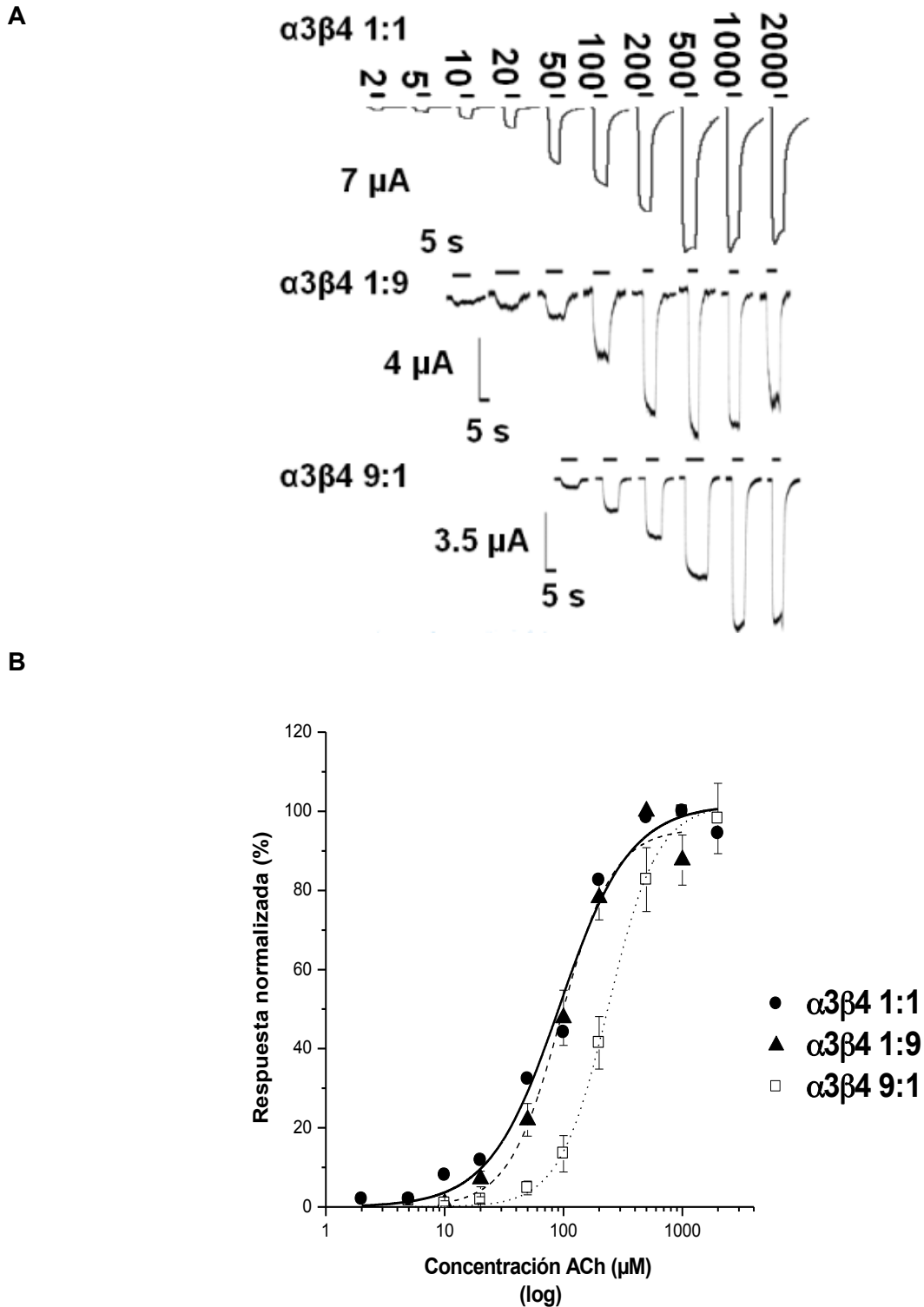


Fig. 34. Efecto de la proporción de ARNm $\alpha 3:\beta 4$ en la sensibilidad a ACh del nAChR $\alpha 3\beta 4$ humano. Los trazos en (A) representan corrientes de entrada inducidas por diferentes concentraciones de ACh (en μM) aplicadas en ovocitos inyectados con la proporción de ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$ indicados (de arriba a abajo: 1:1, 1:9 and 9:1). La duración del pulso de ACh se muestra en la línea sólida de cada trazo. El potencial de membrana de los ovocitos fue de -70 mV. En la figura (B) se muestran las curvas concentración-respuesta, ajustadas con la ecuación de Hill obtenidas en ovocitos inyectados con las mezclas de ARNm mencionadas (1:1 ●; 1:9 ▲; 9:1 □). Obsérvese como la transfección 1:9 y 1:1 produce receptores que son más sensibles a ACh. Los parámetros obtenidos tras el ajuste se resumen en la Tabla 8.

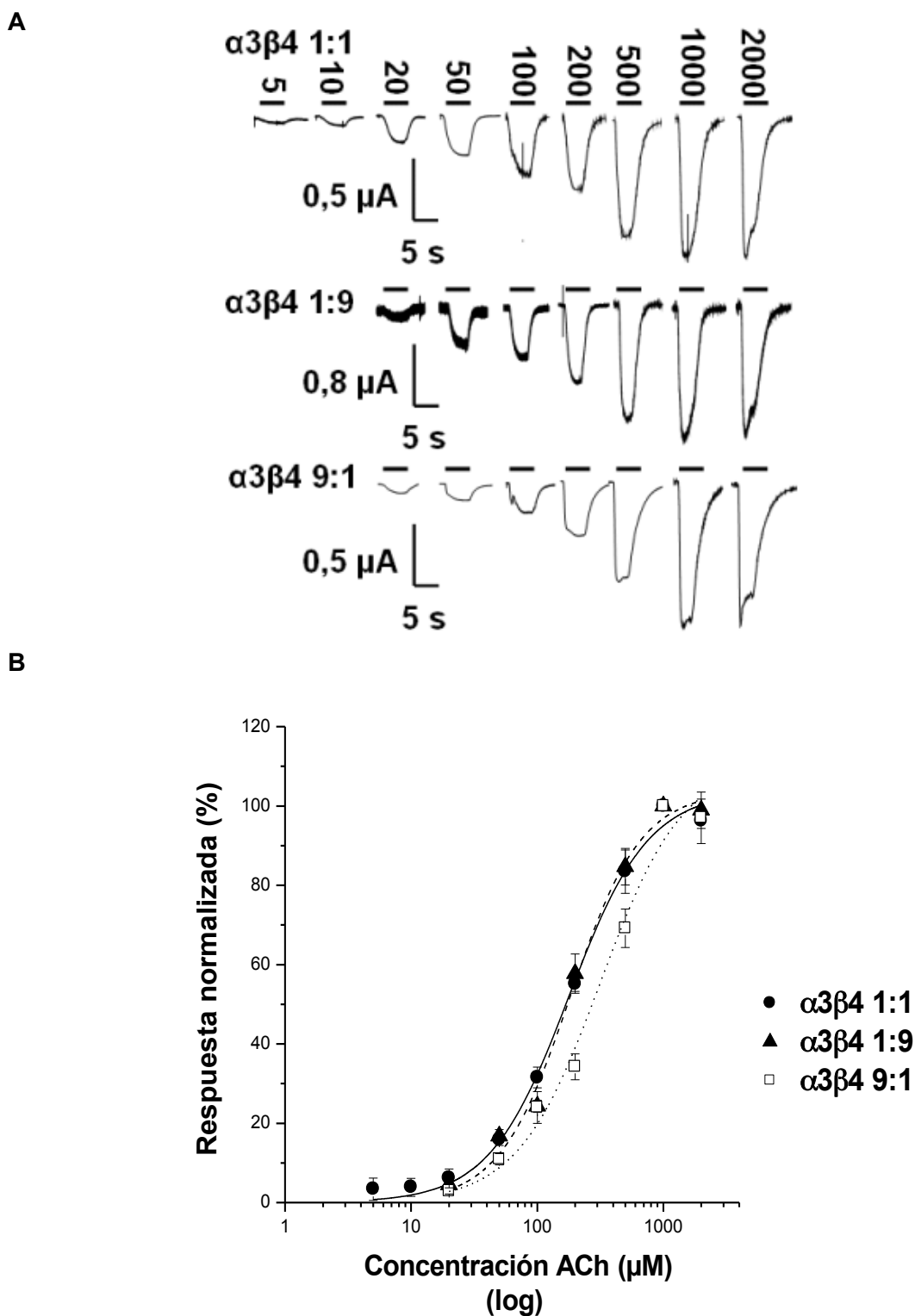


Fig. 35. Efecto de la proporción de ARNm $\alpha 3:\beta 4$ en la sensibilidad a ACh del nAChR $\alpha 3\beta 4$ bovino. En (A) se muestran los trazos representativos de respuestas en célula entera bajo las condiciones de inyección de ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$ indicadas en la figura (de arriba a abajo: 1:1, 1:9 and 9:1). Los ovocitos se mantuvieron con un potencial de membrana de -70 mV. Las curvas concentración-respuesta de las corrientes inducidas por ACh (normalizadas respecto a la I_{max} evocada por ACh) en ovocitos inyectados con las mencionadas mezclas (1:1 ●; 1:9 ▲; 9:1 □) se muestran en (B). La transfección de la proporción 1:9 y 1:1 produce receptores que son más sensibles a ACh. Los parámetros obtenidos del ajuste de las curvas se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8. Efecto funcional de los receptores nicotínicos de ACh $\alpha 3\beta 4$ bovinos y humanos expresados en ovocitos en proporciones extremas de subunidades.

| <i>nAChRs humano</i> | | | | | <i>nAChRs bovino</i> | | |
|---|-----------------------|---------------------------|-----------|-----|-----------------------|---------------------------|-----------|
| Ovocitos | CE ₅₀ (μM) | I _{max} ACh (μA) | nH | n | CE ₅₀ (μM) | I _{max} ACh (μA) | nH |
| $\alpha 3\beta 4$ 1:9 | 97,91±9,83 | 4,67±1,64 | 2,11±0,22 | 4/3 | 206,61±16,74 | 0,68±0,14 | 1,34±0,07 |
| $\alpha 3\beta 4$ 1:1 | 92,95±13,56 | 3,48±1,2 | 1,67±0,17 | 3/2 | 171,68±10,31 | 1,44±0,38 | 1,41±0,06 |
| $\alpha 3\beta 4$ 9:1 | 256,71±47,44 | 3,91±0,95 | 3,04±0,33 | 5/5 | 319,38±37,91 | 1,1±0,22 | 2,31±0,15 |

CE₅₀, I_{max} y el coeficiente de Hill (nH) se representan como la media ± E.M.S del ajuste de cada curva concentración-respuesta individual a la ecuación de Hill. "n" es el número de ovocitos estudiados procedentes de al menos dos donadores diferentes.

En el caso de las subunidades humanas, los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ expresados en los ovocitos inyectados con una proporción de ARNm $\alpha 3:\beta 4$ 1:9 mostraron una mayor sensibilidad a ACh, mientras que los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ de los ovocitos inyectados con una proporción 9:1 tuvieron una menor sensibilidad a ACh de 2,7 veces (CE₅₀ 97,91±9,83 vs. CE₅₀ 256,71±47,44 μM, $p < 0,05$, t-Test student, $n = 9$ y 5 respectivamente). Curiosamente, los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ de los ovocitos inyectados con una proporción 1:1 de subunidades exhibieron una sensibilidad similar a la de los ovocitos 1:9 (CE₅₀ 92,95±13,56 μM), lo que sugiere la preferencia del ovocito por la formación de nAChRs $\alpha 3\beta 4$ con la estequiometría presente en los ovocitos 1:9. Basándonos en lo ya descrito para el receptor $\alpha 4\beta 2$, deducimos que la inyección de un exceso de subunidades $\alpha 3$ en ovocitos fuerza la formación de un nAChR $\alpha 3\beta 4$ con una estequiometría de tres subunidades $\alpha 3$ y dos subunidades $\beta 4$, formándose la estequiometría opuesta cuando se inyecta un exceso de subunidades $\beta 4$ y que cuando inyectamos una mezcla equimolecular de ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$, el ovocito formaría un receptor compuesto con dos

subunidades $\alpha 3$ y tres subunidades $\beta 4$. Esta hipótesis se confirma con lo descrito por Boorman y colaboradores en 2000, cuando confirmaron que la estequiometría del receptor expresado en ovocitos inyectados con una proporción de subunidades 1:1 $\alpha 3:\beta 4$ humanas es de 2 α :3 β .

En cuanto a la amplitud de las corrientes generadas por concentraciones máximas de ACh, no encontramos diferencias significativas entre los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ obtenidos en ovocitos inyectados con una igual cantidad de ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$ ($3,48 \pm 1,2 \mu A$) y ovocitos $\alpha 3:\beta 4$ 1:9 ($4,67 \pm 1,64 \mu A$) u ovocitos $\alpha 3:\beta 4$ 9:1 ($3,91 \pm 0,95 \mu A$), en los que se mantuvo siempre constante la cantidad de ARN inyectado.

En el caso de los ovocitos inyectados con subunidades bovinas obtuvimos resultados similares, aunque los valores de CE_{50} fueron ligeramente mayores en todos los casos. Como en el caso anterior, los ovocitos inyectados con una proporción de ARNm bovino $\alpha 3:\beta 4$ 1:9 mostraron una mayor sensibilidad a ACh (CE_{50} $206,61 \pm 16,74 \mu M$), de forma similar que los ovocitos 1:1 (CE_{50} de $171,68 \pm 10,31 \mu M$; no existen diferencias estadísticamente significativas). Sin embargo, y al igual que sus homólogos humanos, los receptores bovinos expresados en los ovocitos 9:1 exhibieron una menor sensibilidad a ACh, cuantificada en 1,9 veces (CE_{50} $319,38 \pm 37,91 \mu M$; $p < 0,01$, t-Test student, $n = 5$).

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la amplitud de las corrientes máximas generadas por ACh, en los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados en ovocitos 1:9 ($0,68 \pm 0,14 \mu A$), 1:1 ($1,44 \pm 0,38 \mu A$) o 9:1 ($1,1 \pm 0,22 \mu A$).

4.2.2. Ovocitos $\alpha 3\beta 4$ bovinos 1:9 y 9:1 exhiben una similar sensibilidad a oxo-M.

Dado que la diferencia de sensibilidades a ACh entre las supuestas estequiometrías no es tan acusada como la descrita para el nAChR $\alpha 4\beta 2$ (cifrada en 80 veces), y que las diferencias en la sensibilidad a distintos agonistas colinérgicos descritas por el grupo de L. Sivilotti (Krashia y *col.*, 2010) en ovocitos inyectados con las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ humanas con una proporción de 1:9 y 9:1 no son del todo evidentes, se evaluó los efectos del agonista colinérgico oxo-M en un intento de diferenciar farmacológicamente los receptores obtenidos en las poblaciones de ovocitos en estudio. Como ya se ha comentado anteriormente, las dos estequiometrías descritas para el receptor $\alpha 4\beta 2$ exhiben distintas sensibilidades a agonistas nicotínicos, observándose diferencias en los valores de potencia y eficacia a los mismos según la

estequiometría considerada (Moroni y col., 2006). Es lógico pensar que el receptor $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, a parte de su diferente sensibilidad a ACh, difiera de la forma con tres subunidades α en otras propiedades como podría ser en su comportamiento a oxo-M. Esto constituiría una herramienta útil a la hora de caracterizar receptores nativos.

La figura 36.A muestra ejemplos de corrientes de entrada generadas por diferentes concentraciones de oxo-M en ovocitos inyectados con ARNm $\alpha 3:\beta 4$ bovino en proporciones 1:9, 1:1 y 9:1. Observamos que al igual a lo ya descrito en el apartado 3.1.1 para ovocitos inyectados con ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$ humano y bovino en proporción 1:1, las concentraciones de oxo-M usadas producen corrientes con una cinética similar a las evocadas por ACh en cada una de las poblaciones de ovocitos estudiadas. La figura 36.B muestra las curvas concentración-respuesta a oxo-M correspondientes a cada población de ovocitos. Vemos como las curvas se superponen no observándose diferencias en cuanto a potencia y/o eficacia en cada tipo de receptor. Como ocurría en ovocitos 1:1 para el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino, oxo-M se comportó como un agonista parcial en ovocitos 1:9 y 9:1 ($p < 0,01$ y $0,05$; t-Test student, $n=3$ y 9 respectivamente), activando corrientes de entrada de un $32,89 \pm 4,31\%$ y de un $34,59 \pm 4,65\%$ relativas a la corriente máxima generada por ACh 1mM respectivamente.

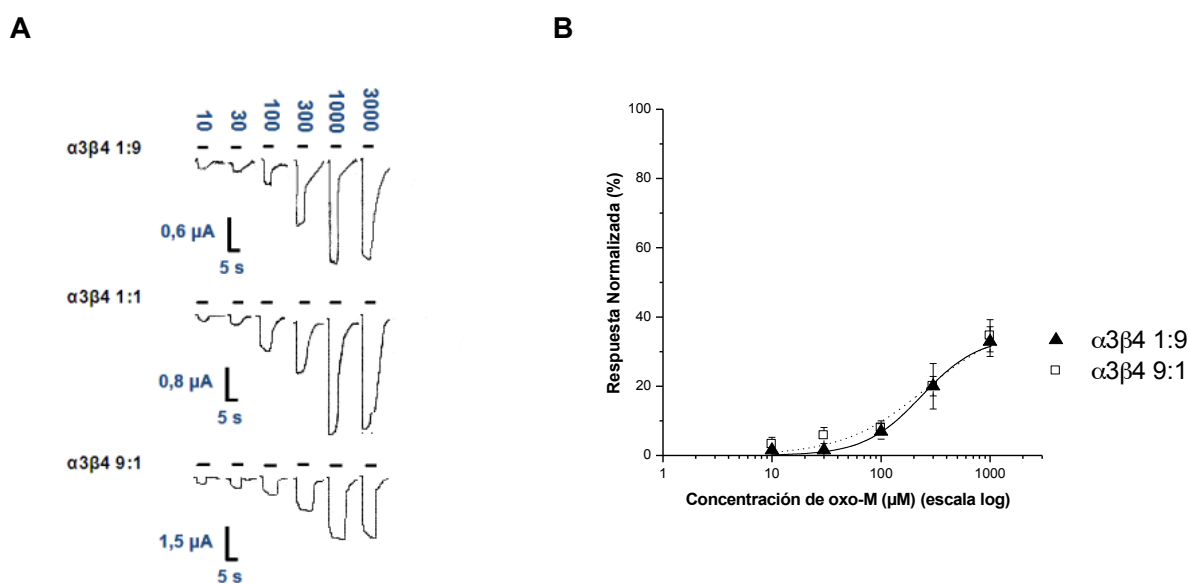


Fig. 36. Efecto de la proporción de ARNm $\alpha 3:\beta 4$ en la sensibilidad a Oxo-M del nAChR $\alpha 3\beta 4$ bovino. Los trazos originales en (A) son ejemplos representativos de las corrientes de entrada inducidas por diferentes concentraciones de oxo-M (en μM) y registradas en ovocitos inyectados con una proporción de subunidades de 1:1, 1:9 y 9:1. El potencial de membrana de las células fue de -70 mV. La duración de la aplicación de los pulsos de oxo-M fue de 5 s como se muestra en cada trazo (barra sólida). En (B) se muestran las curvas concentración-respuesta para las corrientes de célula entera generadas por oxo-M (normalizadas respecto a la I_{max} inducida por ACh) en ovocitos inyectados con las mencionadas mezclas de ARNm (1:9 \blacktriangle ; 9:1 \square). Obsérvese como la oxo-M solo activó corrientes de una amplitud parcial en ambas poblaciones de ovocitos. Los parámetros obtenidos del ajuste de los datos a la ecuación de Hill se muestran en la Tabla 9. Los datos son resultado de la media de 3 a 5 experimentos llevados a cabo usando ovocitos de al menos dos donadores distintos.

En cuanto a potencia, los valores de CE_{50} mostrados en la tabla 9 muestran que los receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados mediante proporciones extremas de subunidades no exhiben diferencias significativas en cuanto a su sensibilidad a oxo-M, $232,69 \pm 5,8$ vs. $273,97 \pm 30,7$ μM ($n=3$ y 9 respectivamente) para las proporciones 1:9 y 9:1. Si tomamos como referencia al agonista fisiológico y estándar de nuestros experimentos, ACh (ver figura 37.A, B y C, línea continua), observamos como oxo-M es prácticamente igual de potente a este agonista en todas las poblaciones de ovocitos estudiadas. Así, la potencia relativa de Oxo-M a ACh es de 0,89 en ovocitos 1:9, e igual a 1,2 en ovocitos 9:1. Si recordamos la potencia relativa a ACh de la molécula Oxo-M en ovocitos 1:1, ésta era de 0,73, lo que está de acuerdo con los presentes datos.

TABLA 9. Efecto funcional de oxo-M sobre los receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados en ovocitos en proporciones extremas de subunidades.

| | CE_{50} (μM) | I/I_{\max} ACh (μA) | Potencias relativas | nH | n |
|--|-----------------------|------------------------------|------------------------|-----------------|-----|
| <u>$\alpha 3\beta 4$ 1:9</u> | | | | | |
| ACh | $206,61 \pm 16,74$ | 1 | 1 | $1,34 \pm 0,07$ | 9/3 |
| oxo-M | $232,69 \pm 5,8$ | $0,33 \pm 0,04$ | 0,89 | $1,67 \pm 0,3$ | 3/2 |
| <u>$\alpha 3\beta 4$ 1:1</u> | | | | | |
| ACh | $171,68 \pm 10,31$ | 1 | 1 | $1,41 \pm 0,06$ | 5/2 |
| oxo-M | $234,4 \pm 47,30$ | $0,35 \pm 0,03$ | 0,73 | $1,67 \pm 0,26$ | 8/3 |
| <u>$\alpha 3\beta 4$ 9:1</u> | | | | | |
| ACh | $319,38 \pm 37,91$ | 1 | 1 | $2,31 \pm 0,15$ | 5/5 |
| oxo-M | $273,97 \pm 30,7$ | $0,35 \pm 0,05$ | 1,2 | $1,59 \pm 0,24$ | 9/3 |

CE_{50} , I_{\max} y el coeficiente de Hill (nH) se representan como la media \pm E.M.S del ajuste de cada curva concentración-respuesta individual a la ecuación de Hill. Las potencias relativas se estimaron a partir de la potencia media de las curvas individuales resultantes de un ajuste libre y se expresan en relación a ACh. "n" es el número de ovocitos estudiados procedentes de al menos dos donadores diferentes.

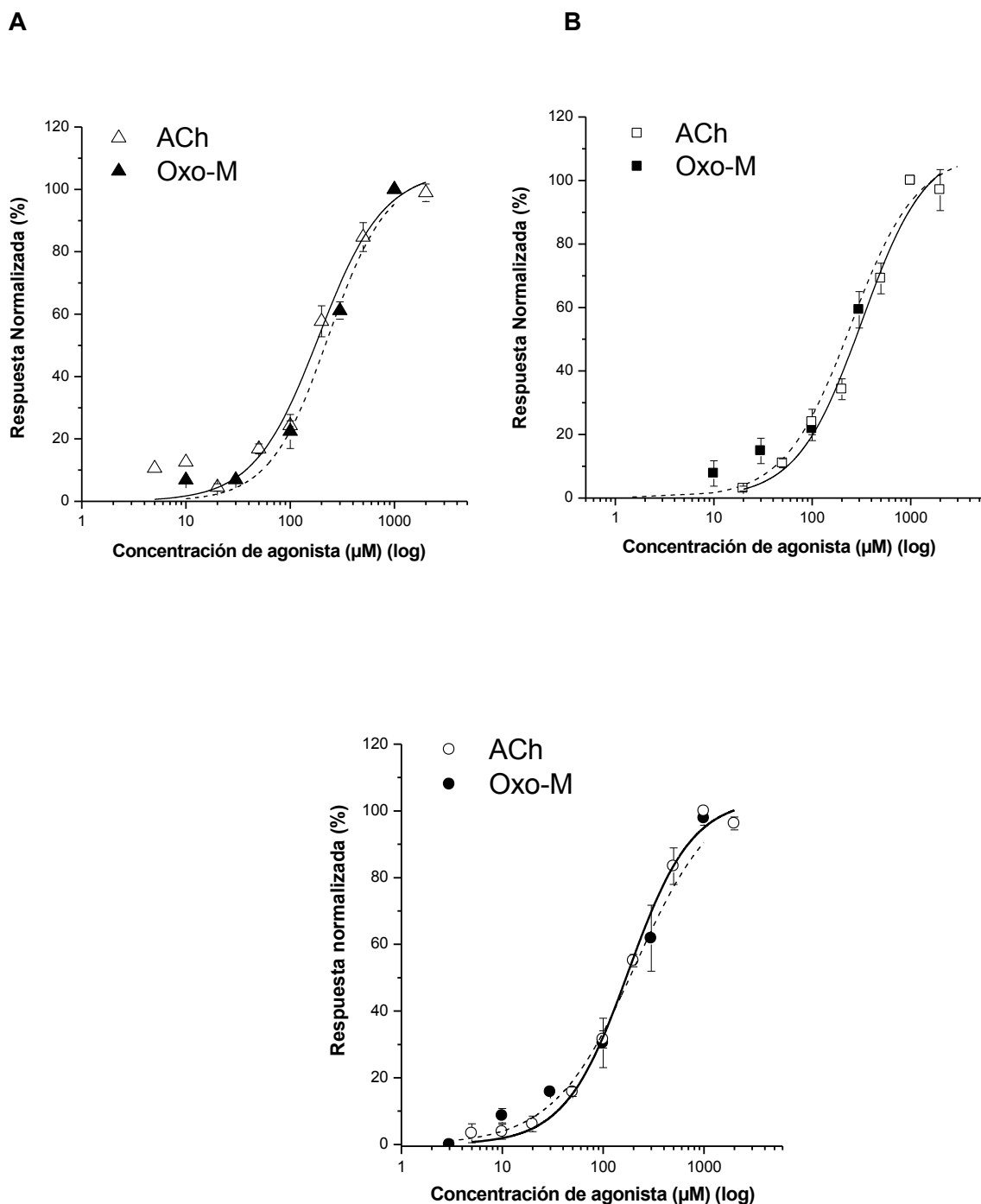


Fig. 37. Curvas concentración-respuesta a ACh y oxo-M en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ bovinos. ACh y oxo-M ejercieron un efecto similar sobre los receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos con dos (\blacktriangle) o tres (\square) subunidades α . (A), (B) y (C) muestra las curvas concentración-respuesta para ACh y oxo-M (normalizadas respecto a la I_{\max} evocada por cada agonista) en un intento de estimar las potencias relativas de ambos agonistas en ovocitos inyectados con las proporciones de subunidades 1:1 (\bullet o \circ); 1:9 (\blacktriangle o \triangle); 9:1 (\blacksquare o \square). Obsérvese la misma potencia de oxo-M y ACh en cada población de ovocitos (0.89 vs. 1.2 veces respecto de la CE_{50} de la curva concentración-respuesta a ACh en ovocitos 1:9 y 9:1 respectivamente). Las potencias relativas a ACh también se muestran en la tabla 9.

4.2.3. Modulación diferencial por Zn^{2+} en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 1:9 y 9:1.

En los dos apartados anteriores mostramos como la estequiometría del receptor influye sobre las propiedades funcionales del nAChR $\alpha 3\beta 4$. ¿Cuál es la base estructural para estas diferencias? Por homología al nAChR del pez *Torpedo*, se piensa que los sitios de unión a ACh en el receptor $\alpha 3\beta 4$ se localizan en las interfases de las subunidades $\alpha 3(+)$ y $\beta 4(-)$. Dado que estas interfases están presentes en las dos supuestas estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$, las diferencias funcionales entre los nAChRs $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ no pueden atribuirse a la estructura de los sitios de unión a ACh. Una posible explicación es que la quinta subunidad, que no contribuye al bolsillo de unión y que difiere en ambos tipos de receptores, puede contribuir en la formación de dominios específicos de cada estequiometría que pueden influir a su vez en la función del receptor. Para explorar esta posibilidad y para un mejor entendimiento de la relación estructura–función de las dos formas alternativas del receptor $\alpha 3\beta 4$, estudiamos la sensibilidad de $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ a la modulación por Zn^{2+} . El Zn^{2+} es un catión divalente y se ha descrito que puede modular al nAChR $\alpha 3\beta 4$ (Hsiao y col., 2001)

La función de la superfamilia de receptores con lazo Cys en el cerebro está muy influenciada por Zn^{2+} que, durante la actividad neuronal, puede alcanzar concentraciones de hasta 300 μM (Assaf y col., 1984; Vogt y col., 2000). Se han identificado residuos aminoacídicos que forman el sitio de unión a Zn^{2+} en los receptores GABA_A (Hosie y col., 2003) y en receptores de glicina sensibles a estricnina (Miller y col., 2005). Se ha demostrado también que los nAChRs neuronales exhiben una modulación diferencial por el ión Zn^{2+} en el SNC e *in Vitro* dependiendo de la composición de subunidades del receptor. El Zn^{2+} inhibe los receptores $\alpha 7$ homoméricos a concentraciones micromolares (Palma y col., 1996), mientras que en los receptores $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 2\beta 2$, pero no en los $\alpha 3\beta 2$, concentraciones submilimolares potencian las respuestas a ACh (García-Colunga y col., 2001; Hsiao y col., 2001). Todos los miembros de la familia de los receptores nicotínicos comparten una drástica reducción en sus valores de conductancia en presencia de concentraciones milimolares de Zn^{2+} .

Tanto en la familia de receptores con lazo Cys como en los receptores de NMDA la composición de subunidades juega un papel crucial en la modulación por Zn^{2+} , destacando la contribución diferencial de las interfases entre las subunidades en los efectos mediados por Zn^{2+} (Paoletti y col., 1997; Hosie y col., 2003; Miller y col., 2005). Por ejemplo, se ha descrito que los receptores de GABA_A con una composición en

subunidades α y β son 3.400 veces más sensibles a zinc comparados con sus homólogos $\alpha\beta\gamma$ (Smart y col., 1991)

En el mejor caracterizado receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, se ha descrito que la potenciación por Zn^{2+} de respuestas submáximas a ACh es específica de la estequiometría y solo ocurre en receptores con tres copias de la subunidad α (Moroni y col., 2008). Se han identificado aminoácidos específicos en la interfase $\alpha 4$ - $\alpha 4$ como fundamentales para la potenciación, en particular residuos ácidos en el lazo C amino-terminal del lado + de la interfase entre subunidades, junto con residuos de histidina en el lazo F, lado – (ver figura 38.C.). La comparación de las secuencias proteicas $\alpha 3$, $\beta 4$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ muestra residuos equivalentes entre las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ y la subunidad $\beta 4$ humana y bovina, pero no con la subunidad $\alpha 3$ de ambas especies.

La homología con el receptor $\alpha 4\beta 2$ y el estudio comparativo inicial de las secuencias sugieren que podría existir una interfase potencial de modulación por Zn^{2+} en el receptor $\alpha 3\beta 4$ y que posiblemente ésta sería la interfase $\beta 4$ - $\beta 4$, al estar solo presente en la forma con dos subunidades α del receptor $\alpha 3\beta 4$ (que se expresa en ovocitos con proporciones de ARNm $\alpha:\beta$ 1:1 y 1:9). Hemos verificado esta hipótesis mediante el estudio del efecto del Zn^{2+} sobre las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$ en ovocitos, obteniendo los resultados que se exponen a continuación.

Los trazos de la figura 38.A. muestran el efecto de concentraciones ascendentes de Zn^{2+} en las corrientes de entrada evocadas por ACh 100 μ M en el receptor $\alpha 3\beta 4$ humano expresado en ovocitos 1:9 y en ovocitos 9:1. Este valor de concentración se corresponde con la CE_{50} del receptor $\alpha 3\beta 4$ 1:9 y la CE_{10} del $\alpha 3\beta 4$ 9:1. En la figura 38.B. se representan las curvas concentración-respuesta correspondientes al promedio de las respuestas normalizadas. Como pensábamos, no se observó potenciación de las respuestas a ACh en los receptores con tres subunidades α del receptor $\alpha 3\beta 4$ ($\alpha 3\beta 4$ 9:1; \square): el Zn^{2+} inhibió las corrientes generadas por ACh con una CI_{50} de $1,37 \pm 0,21$ mM y un nH de $1,28 \pm 0,23$ (n=4 de 2 donadores). Por el contrario, Zn^{2+} exhibió un comportamiento complejo en la forma con 2 subunidades α para el receptor $\alpha 3\beta 4$ ($\alpha 3\beta 4$ 1:9; \blacktriangle). Concentraciones bajas de Zn^{2+} (de 0,3 a 2 mM) potenciaron las respuestas a ACh hasta un $54,29 \pm 8,12\%$ ($p < 0,05$; t-Test student), obteniéndose valores de CE_{50} y nH de $251,76 \pm 33,6$ μ M y $2,3 \pm 0,2$, respectivamente. Concentraciones mayores a 2 mM inhibieron las respuestas a ACh con una CI_{50} de $3,11 \pm 0,8$ mM y un nH de $2,1 \pm 0,2$ (n=5 de dos donadores).

El hecho de que las respuestas del receptor $\alpha 3\beta 4$ con dos subunidades α a ACh pueden ser potenciadas o inhibidas dependiendo de la concentración de Zn^{2+} , concuerda con los resultados obtenidos por Hsiao y colaboradores en 2001, en ovocitos inyectados con ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$ en proporción 1:1. Este resultado confirma a

su vez nuestra afirmación de que los ovocitos inyectados con igual cantidad de ARNm $\alpha 3$ y $\beta 4$ expresan preferentemente el receptor con dos subunidades α (Boorman y *col.*, 2000).

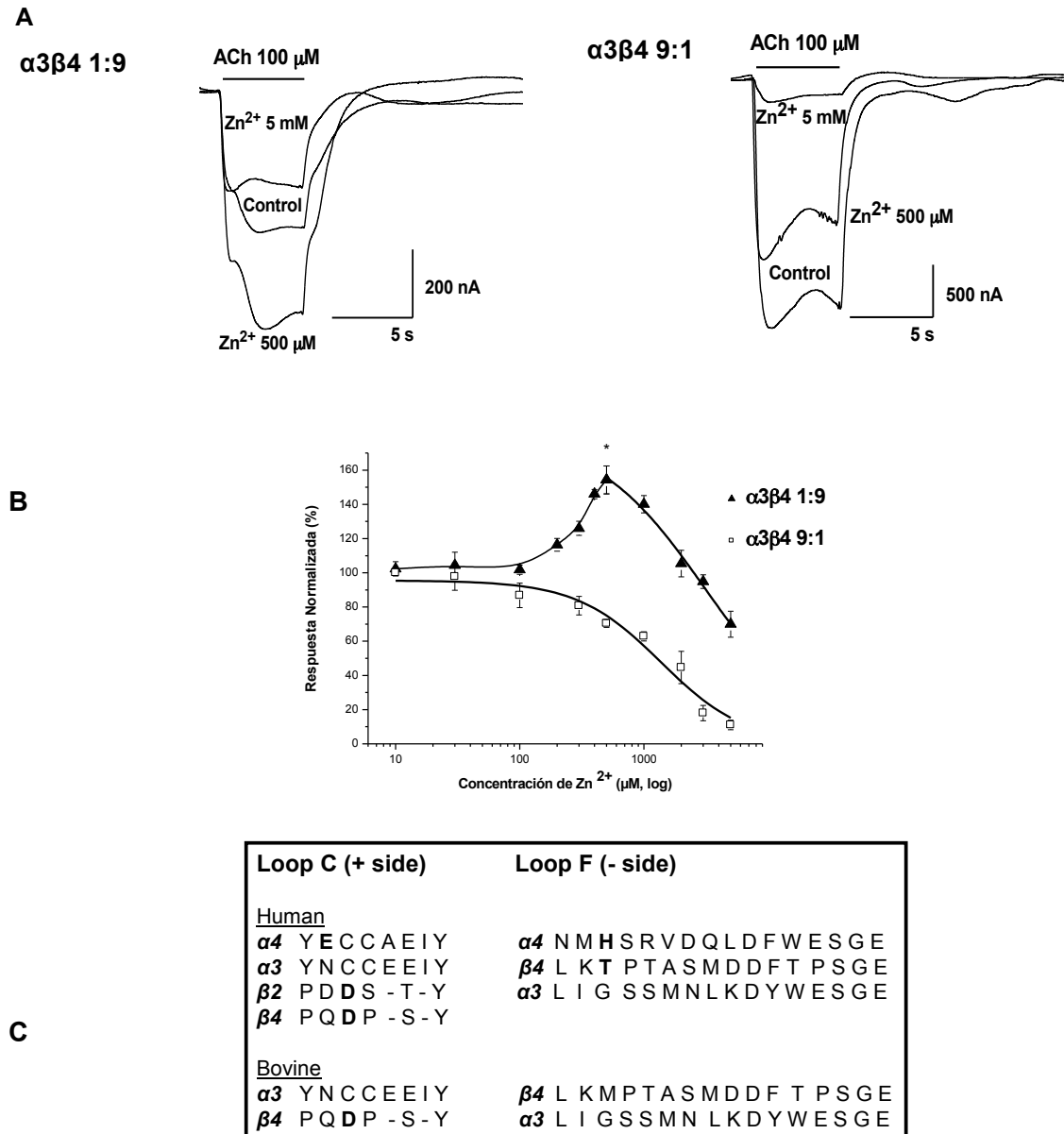
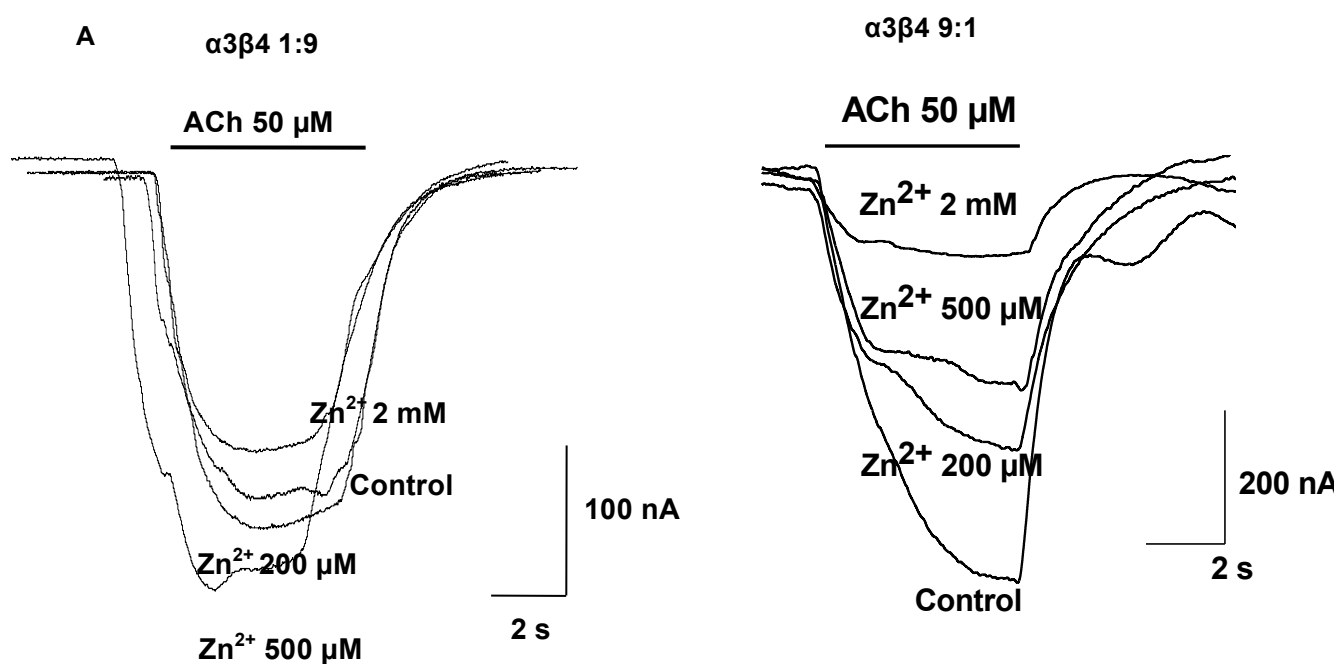


Fig. 38. Sensibilidad diferencial a la modulación por Zn²⁺ de las dos formas alternativas del nAChR $\alpha 3\beta 4$ humano expresadas heterológicamente en ovocitos de *Xenopus*. Los trazos en (A) representan corrientes originales activadas por ACh 100 μ M en el receptor ($\alpha 3$)₂($\beta 4$)₃ (izquierda, proporción 1:9 de subunidades α : β inyectadas) y en el receptor ($\alpha 3$)₃($\beta 4$)₂ (derecha, proporción de subunidades 9:1) en presencia de concentraciones crecientes del ión Zn²⁺. El Zn²⁺ se aplicó junto con ACh durante 5 s (barra superior al trazo) en cada ovocito. La figura (B) muestra las curvas concentración-respuesta a Zn²⁺ para el receptor con tres subunidades α (□) y para el receptor con dos subunidades α (▲). Las curvas representadas son resultado del promedio de curvas obtenidas en ovocitos individuales y se ajustaron a la ecuación de Hill o a la suma de dos ecuaciones de Hill, respectivamente. Obsérvese como el Zn²⁺ potenció solo las respuesta a ACh en los ovocitos que expresaban la estequiometría con dos subunidades α . *P<0,05 cuando comparamos con la corriente generada por la ACh en ausencia de Zn²⁺. La tabla (C) muestra el alineamiento de la secuencia del lazo C y del lazo F de distintas subunidades nicotínicas. En negrita se muestran los residuos de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ implicados en la modulación por Zn²⁺ de las respuestas a ACh en el receptor $\alpha 4\beta 2$ y los correspondientes residuos en la subunidad $\beta 4$.

Sin embargo, en el caso del receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino albergábamos ciertas dudas en cuanto a si éste era potenciado o no por Zn^{2+} puesto que al estudiar la secuencia de la subunidad $\beta 4$ no encontramos residuos acídicos equivalentes a aquellos localizados en el lazo F, lado – de la subunidad $\alpha 4$ del receptor $\alpha 4\beta 2$ (ver figura 38.C.). Realizamos experimentos similares a los anteriormente descritos para estudiar el efecto del Zn^{2+} sobre las dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$. Los trazos de la figura 39.A. muestran el efecto de concentraciones ascendentes de Zn^{2+} en las corrientes de entrada generadas por 50 μM de ACh para el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino expresado en ovocitos 1:9 y en ovocitos 9:1. Este valor de concentración se corresponde aproximadamente con la CE_{20} de las dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino. En la figura 39.B. se representan el promedio de las respuestas normalizadas resultantes de la co-aplicación de Zn^{2+} a concentraciones de 200, 500 μM y 2 mM con ACh. Elegimos estos valores de Zn^{2+} al encontrarse en el rango de concentración con mayor efecto potenciador sobre la forma con dos subunidades α . Al igual que lo observado anteriormente, no se observó potenciación de las respuestas a ACh en los receptores con tres subunidades α del receptor $\alpha 3\beta 4$ ($\alpha 3\beta 4$ 9:1; barras en blanco) ($n=5$, 2 donadores), produciéndose una disminución progresiva de las respuestas a mayores concentraciones de Zn^{2+} . Por el contrario, el Zn^{2+} ejerció su efecto potenciador en la forma con dos subunidades α para el receptor $\alpha 3\beta 4$ bovino ($\alpha 3\beta 4$ 1:9; barras grises), intuyéndose su comportamiento bifásico al observarse un $17,75 \pm 1,54$ % ($p < 0,05$; t-Test) de inhibición a la mayor concentración de Zn^{2+} estudiada. El Zn^{2+} potenció las respuestas a ACh hasta un $36,17 \pm 3,32$ % ($p < 0,05$; t-Test; $n=6$, 2 donadores).



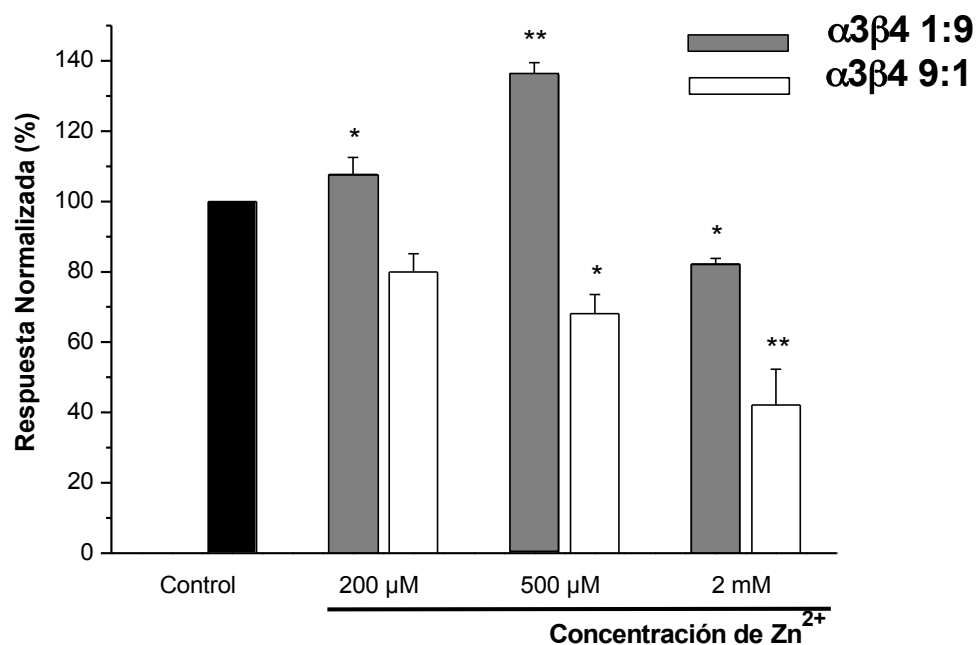


Fig. 39. Sensibilidad diferencial a la modulación por Zn^{2+} de las dos formas alternativas del nAChR $\alpha 3\beta 4$ bovino expresadas heterológicamente en ovocitos de *Xenopus*. La figura (A) muestra corrientes originales activadas por la CE_{20} de ACh para los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ (izquierda, proporción 1:9 de subunidades $\alpha:\beta$ inyectadas) y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ (derecha, proporción 9:1 de subunidades $\alpha:\beta$ inyectadas) en presencia de concentraciones crecientes de Zn^{2+} . El Zn^{2+} se aplicó junto con ACh durante 5 s (ver barra superior al trazo). La figura (B) muestra las respuestas expresadas como el porcentaje de corriente evocado por ACh 50 μM en cada tipo de receptor $\alpha 3\beta 4$ estudiado. La gráfica de barras se construyó a partir de la media \pm E.M.S de los datos recopilados. Obsérvese como el ión Zn^{2+} potenció solo las respuestas a ACh en los ovocitos que expresaban la estequiometría con dos subunidades α del receptor ($\alpha 3\beta 4$ 1:9, barras en gris). ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$, cuando comparamos con la corriente potenciada o bloqueada por Zn^{2+} con la corriente generada por ACh 50 μM en ausencia del ión.

4.2.4. Los receptores expresados en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 1:9 y 9:1 difieren en sus propiedades a nivel de canal único.

Como ya hemos comentado anteriormente los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ expresados en ovocitos abren mayoritariamente en ráfagas duraderas de baja conductancia (Sivilotti y col., 1997; Boorman y col., 2003), lo que interpretado según los resultados descritos en los apartados anteriores sugiere que estas aperturas son resultado de la actividad de receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$. Similares resultados se obtienen cuando las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ se transfectan de forma estable en fibroblastos de ratón en una proporción 1:1,

donde además se observan la actividad de un tipo de canal adicional, con ráfagas más cortas y una mayor conductancia de 36 pS (Lewis y col., 1997).

Los resultados publicados por el grupo de la Dra. Sivilotti (Krashia y col., 2010) realizados en células *HEK293* transfectadas con receptores $\alpha 3\beta 4$ humano (experimentos realizados en paralelo a los que se describen a continuación), demuestran que las células de mamífero pueden expresar los dos tipos de canales con las características ya mencionadas dependiendo de la proporción de subunidades $\alpha:\beta$ inyectada, sugiriendo la posibilidad de que los canales que abren en ráfagas cortas y con alta conductancia se corresponden con la estequiometría de tres subunidades α . Resultados similares que respaldan esta hipótesis se obtuvieron en los experimentos que se describen a continuación.

Los trazos representados en la figura 40 se corresponden a corrientes representativas de registros de canal único generadas por la aplicación de ACh 5 μ M en parches cell-attached a un potencial de -100 mV. Se utilizaron ovocitos inyectados con ARNm humano para las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ en las proporciones 1:9 (A) y 9:1 (B). Al observar los trazos se evidencia que las aperturas de los receptores presentes en los parches 1:9 son de menor amplitud y que se producen en ráfagas más duraderas, asemejándose al comportamiento de los canales $\alpha 3\beta 4$ humanos expresados en ovocitos con una proporción de subunidades 1:1 (Boorman y col., 2003), cuya estequiometría es $2\alpha:3\beta$ (Boorman y col., 2000). Por otro lado, en los ovocitos 9:1 observamos una segunda clase de aperturas más cortas y de mayor conductancia.

Se realizaron registros de intensidad de las respuestas a ACh a distintos potenciales, desde -40 a -100 mV. Estos datos se representaron en las gráficas que se muestran en la figura 40 para realizar su ajuste a una línea recta, cuya pendiente nos da los valores de conductancia para los canales $\alpha 3\beta 4$ humanos expresados en ovocitos 1:9 (C, \blacktriangle) y 9:1 (\square , D). Los valores de conductancia de estos canales fueron de $29,12 \pm 1,52$ pS (3 parches) y $39,34 \pm 2,12$ pS (4 parches), respectivamente ($p < 0,05$; t-Test).

En el caso de los ovocitos inyectados con subunidades bovinas obtuvimos resultados similares. Los trazos representados en la figura 41 se corresponden a corrientes originales de registros de canal único generadas por la aplicación de ACh 5 μ M en parches cell-attached a un potencial de -100 mV. Se realizó la estrategia habitual de inyección utilizando en este caso ARNm bovino para la obtención de receptores $\alpha 3\beta 4$ con dos (A) y tres subunidades α (B). Como en el caso anterior, los ovocitos inyectados con una proporción de ARNm bovino $\alpha 3:\beta 4$ 1:9 presentan aperturas de los

canales de menor amplitud y se producen en ráfagas más duraderas; mientras que en los ovocitos 9:1 observamos la segunda clase de aperturas más cortas y de mayor conductancia.

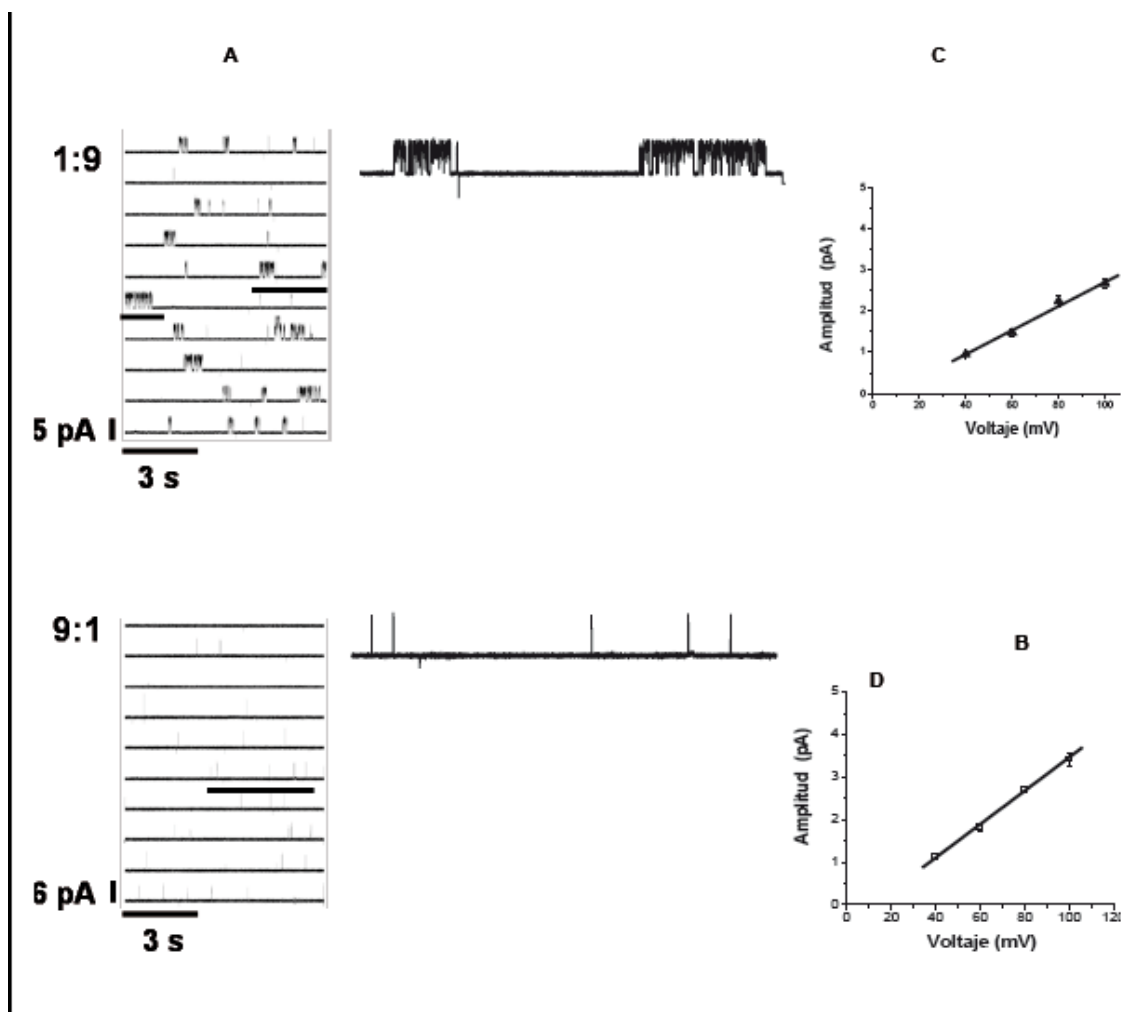


Fig. 40. Propiedades de las corrientes unitarias del receptor $\alpha 3\beta 4$ humano expresado mediante la inyección de proporciones extremas en ovocitos de *Xenopus oocytes*. (A) y (B) representan ejemplos de corrientes cell-attached evocadas por ACh 5 μ M, en ovocitos transfectados con ARNm de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ en proporción 1:9 (arriba) y 9:1 (abajo). Los parches se mantuvieron a -100 mV. Las secciones subrayadas se han maximizado a la derecha. El promedio de las amplitudes de las corrientes de canal único a diferentes potenciales se representan en C para el receptor $\alpha 3\beta 4$ 1:9 (\blacktriangle , 3 parches) y en D para el receptor $\alpha 3\beta 4$ 9:1 (\square , 4 parches). Obsérvese la mayor pendiente de la recta y, por consiguiente, la mayor conductancia de los canales expresados en ovocitos 9:1.

La figura 41 muestra también el ajuste lineal de la representación de los datos de intensidad vs. voltaje (potenciales desde -30 a -100 mV) para el cálculo de los valores de conductancia para cada forma del receptor bovino. Los valores de conductancia fueron para los canales expresados en ovocitos 1:9 (C, \blacktriangle) de $26,92 \pm 2,21$ pS (3

parches) y para los canales de los ovocitos 9:1 (\square , D) de $38,01 \pm 0,94$ pS (4 parches) ($p < 0,001$; t-Test).

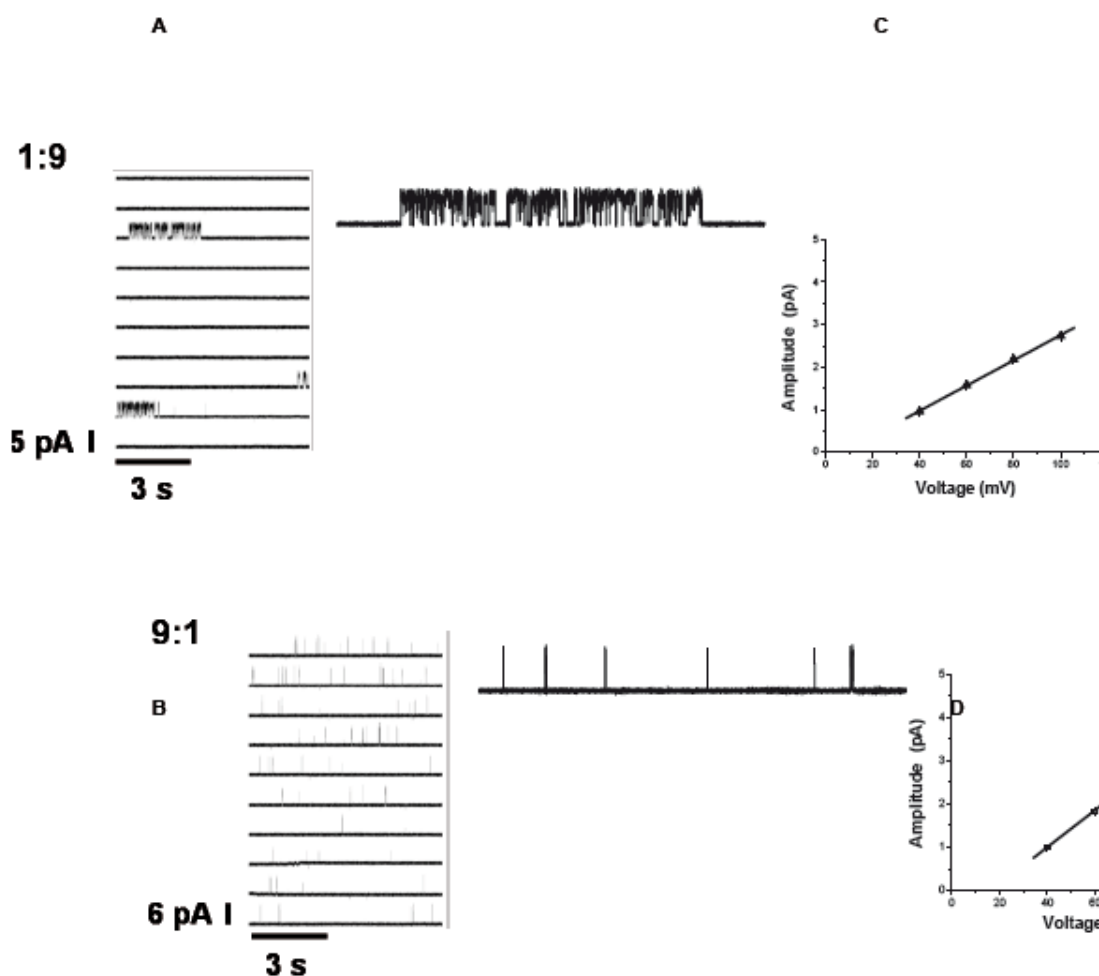


Fig. 41. Propiedades de las corrientes unitarias del receptor $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados mediante la inyección de proporciones extremas en ovocitos de *Xenopus oocytes*. (A) y (C) representan ejemplos de corrientes cell-attached evocadas por ACh 5 μ M en ovocitos transfectados con una proporción de ARNm de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ RNA de 1:9 (arriba) y 9:1 (abajo). Los parches se mantuvieron a -100 mV. Las secciones subrayadas se muestran expandidas a la derecha. El promedio de las amplitudes de las corrientes de canal único a diferentes potenciales se representan en C para el receptor $\alpha 3\beta 4$ 1:9 (\blacktriangle , 3 parches) y en D para el receptor $\alpha 3\beta 4$ 9:1 (\square , 4 parches). Obsérvese la mayor pendiente de la recta y, por consiguiente, la mayor conductancia de los canales expresados en ovocitos 9:1.

4.3.-EXPRESIÓN DE LAS ESTEQUIOMETRÍAS DEL nAChR $\alpha 3\beta 4$ HUMANO MEDIANTE CONCATENACIÓN DE LAS SUBUNIDADES

Los resultados presentados en el apartado anterior sugieren que en cada estequiometría existen interfases de subunidades específicas que pueden conferir características funcionales distintas a cada forma del receptor, como por ejemplo la interfase $\beta 4/\beta 4$ en el receptor $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ o la $\alpha 3/\alpha 3$ en el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$. Sin

embargo, el estudio de su potencial papel en las propiedades del receptor nativo puede dificultarse por el hecho de que en estos receptores pueden existir otras isoformas de las subunidades α o β que pueden dar lugar a interfases homólogas en cuanto a su papel funcional. Los receptores compuestos por múltiples subunidades diferentes no se pueden analizar mediante expresión recombinante de la mezcla de las subunidades monoméricas ya que se formarían distintas poblaciones de receptores en el mismo sistema de expresión heteróloga. Las incertidumbres que emergen de la posible existencia de una tercera subunidad distinta en el receptor nativo se agravan con el problema de la existencia de heterogeneidad en la estequiometría del receptor expresado en sistemas recombinantes. Hasta ahora, se ha descrito que la inyección de las subunidades en proporciones extremas permite el estudio por ejemplo de dos poblaciones de receptores $\alpha 4\beta 2$ homogéneas en ovocitos de *Xenopus* (Moroni y col., 2006). Nuestros resultados revelan que esta estrategia es también válida para el estudio de las dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$. Sin embargo, existe la posibilidad de la contaminación minoritaria de una de las dos isoformas (véase los resultados publicados en relación con las propiedades de canal único en (Krashia y col., 2010), lo cual hace a esta técnica imprecisa a la hora de caracterizar las propiedades funcionales y farmacológicas de cada isoforma del receptor $\alpha 3\beta 4$.

Una estrategia que solventa los problemas derivados de la heterogeneidad de estequiometrías de un receptor y de la presencia de distintas isoformas de subunidades en el mismo sistema de expresión es la producción de receptores con una estequiometría forzada. En estos receptores, la disposición de las subunidades se fija mediante un ordenamiento predeterminado de subunidades que se unen a nivel de ADN para obtener proteínas de fusión. Recientemente, se ha logrado con éxito la expresión de receptores GABA_A (Baumann y col., 2001; Baumann y col., 2002; Baumann y col., 2003), y nAChRs del subtipo $\alpha 3\beta 4$ (Groot-Kormelink y col., 2006) y del subtipo $\alpha 4\beta 2$ (Carbone y col., 2009) formados por subunidades concatenadas. Tal y como muestran los estudios sobre los receptores GABA_A concatenados, esta aproximación ofrece la única posibilidad para el estudio del efecto posicional de mutaciones puntuales (Baumann y col., 2003; Baur y col., 2005) y de los efectos derivados de la presencia de otras isoformas de subunidades en el receptor (Minier y col., 2004; Boulineau y col., 2005).

Basándonos en esta aproximación, se intentó la expresión de las dos supuestas estequiometrías para el nAChR $\alpha 3\beta 4$ mediante la concatenación de las subunidades, con el objetivo de crear un modelo que pudiera facilitar la dilucidación de los

mecanismos estructurales subyacentes a las características funcionales de los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$. Hasta la fecha se han utilizado varias estrategias para construir concatémeros de los receptores de la familia con lazo Cys. Por ejemplo, en el caso de los receptores GABA_A se han utilizado combinaciones de dímeros y trímeros de subunidades y, más recientemente, la concatenación de las cinco subunidades en un único pentámero, para dar lugar a un receptor funcional cuando se expresa en ovocitos de *Xenopus*. Los receptores así formados poseen propiedades similares a los receptores formados a partir de subunidades no-concatenadas (Baumann y col., 2001; Baumann y col., 2002; Minier y col., 2004; Boulineau y col., 2005). En cuanto a los receptores nicotínicos, se han usado hasta ahora construcciones de subunidades en tándem formadas por dos subunidades ligadas mediante un elemento enlazador sintético formado por los aminoácidos alanina-glicina-serina para forzar la estequiometría del receptor $\alpha 4\beta 2$. Sin embargo, esta aproximación puede dar lugar a la formación de dipentámeros (Zhou y col., 2003) o que las subunidades concatenadas no se incorporen totalmente en la estructura pentamérica del receptor, formándose una población de receptores heterogénea en el caso de la expresión del nAChR $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ mediante esta técnica (Groot-Kormelink y col., 2004). Sin embargo, se ha conseguido la expresión funcional de este receptor mediante la unión de las subunidades en un concatémoro pentamérico, sin alteración de sus propiedades funcionales. Conociendo las ventajas e inconvenientes de cada una de las estrategias mostradas, escogimos la combinación de dímeros y trímeros de subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$, teniendo como referencia los resultados satisfactorios hallados en el caso de los receptores GABA_A, y a que se reduce considerablemente las etapas de ligación-restricción, contemplando la posibilidad futura de la unión del dímero y el trímero en un pentámero. Basándonos en el caso de los receptores GABA_A, se utilizaron para la unión de las subunidades del receptor elementos enlazadores de longitud variable que contenían tres residuos de aminoácidos diferentes (glutamina, prolina y alanina). Este elemento enlazador tiene la característica de ser soluble en agua y de carecer de estructura secundaria (conformación random coil), lo que le hacen ser ideal para este propósito. Además, se eliminó el péptido señal de cada subunidad excepto de la primera, con el fin de evitar efectos impredecibles (p.e., inserciones no deseadas de la proteína en la membrana, interferencia en el ensamblaje de las subunidades o proteólisis de la unión entre las unidades) (Baur y col., 2006). Se siguió la aproximación usada para construir el nAChR $\alpha 3\beta 4$ concatenado (Groot-Kormelink y col., 2006), utilizando el mismo orden de subunidades para crear nuestros dímeros y trímeros. Este apartado describe la expresión y la

caracterización funcional en ovocitos de *Xenopus* de los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ humanos concatenados mediante la estrategia descrita.

4.3.1.-La coinyección de las construcciones $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ ó $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ produce receptores con similares características funcionales a los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ formados a partir de subunidades no ligadas.

La figura 42.A. muestra la expresión funcional medible de las construcciones concatémicas en ovocitos de *Xenopus* tras 72 horas después de la microinyección de las subunidades humanas concatenadas $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ y $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$. Las corrientes máximas medibles fueron de $85,20\pm 34,07$ nA ($n=4$, 3 donadores, 24 ng de ARNm por ovocito) y $375,39\pm 8$ nA ($n=6$, 2 donadores, 24 ng de ARNm por ovocito) respectivamente. Estos valores son entre 55 y 10 veces menores que las corrientes obtenidas en los receptores formados a partir de las subunidades no concatenadas, cuyos valores promedio fueron para los receptores $\alpha 3\beta 4$ 1:9 de $4,67\pm 1,64$ μ A ($n=4$, 3 donadores, 5 ng de ARNm por ovocito) y para los receptores $\alpha 3\beta 4$ 9:1 de $3,91\pm 0,95$ μ A ($n=5$, 5 donadores, 5 ng de ARNm por ovocito) (ver tabla 8).

Las propiedades funcionales de los receptores concatenados fueron muy similares a las de los receptores formados a partir de las subunidades no concatenadas. En el caso del receptor $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, las curvas concentración-respuesta a ACh obtenidas indicaron que la concatenación de las subunidades no modificó prácticamente los parámetros del agonista, ya que se obtuvo un valor de CE_{50} de $108,43\pm 12,30$ μ M ($n=4$, 3 donadores) frente a una CE_{50} de $97,91\pm 9,83$ μ M ($n=4$, 3 donadores) en los receptores $\alpha 3\beta 4$ 1:9, aunque sí modificó los valores del coeficiente de Hill ($nH=1,8\pm 0,39$ versus $1.09\pm 0,24$) ($p<0,05$; t-Test). (Figura 42.B.)

De forma similar, para el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ la concatenación de las subunidades tuvo muy poco efecto sobre la curva concentración-respuesta a ACh. El análisis de las curvas concentración-respuesta mostró valores de CE_{50} muy similares ($235,24\pm 22,59$ μ M, $n=5$, 2 donadores versus $256,71\pm 47,44$ μ M, $n=5$, 5 donadores, para el receptor concatémico y el receptor formado por las subunidades libres respectivamente). Sin embargo, sí que se observó una gran diferencia en los valores de los coeficientes de Hill obtenidos ($1,15\pm 0,06$ y $3,04\pm 0,33$, respectivamente; $p<0,01$; t-Test. (Figura 42.C.)

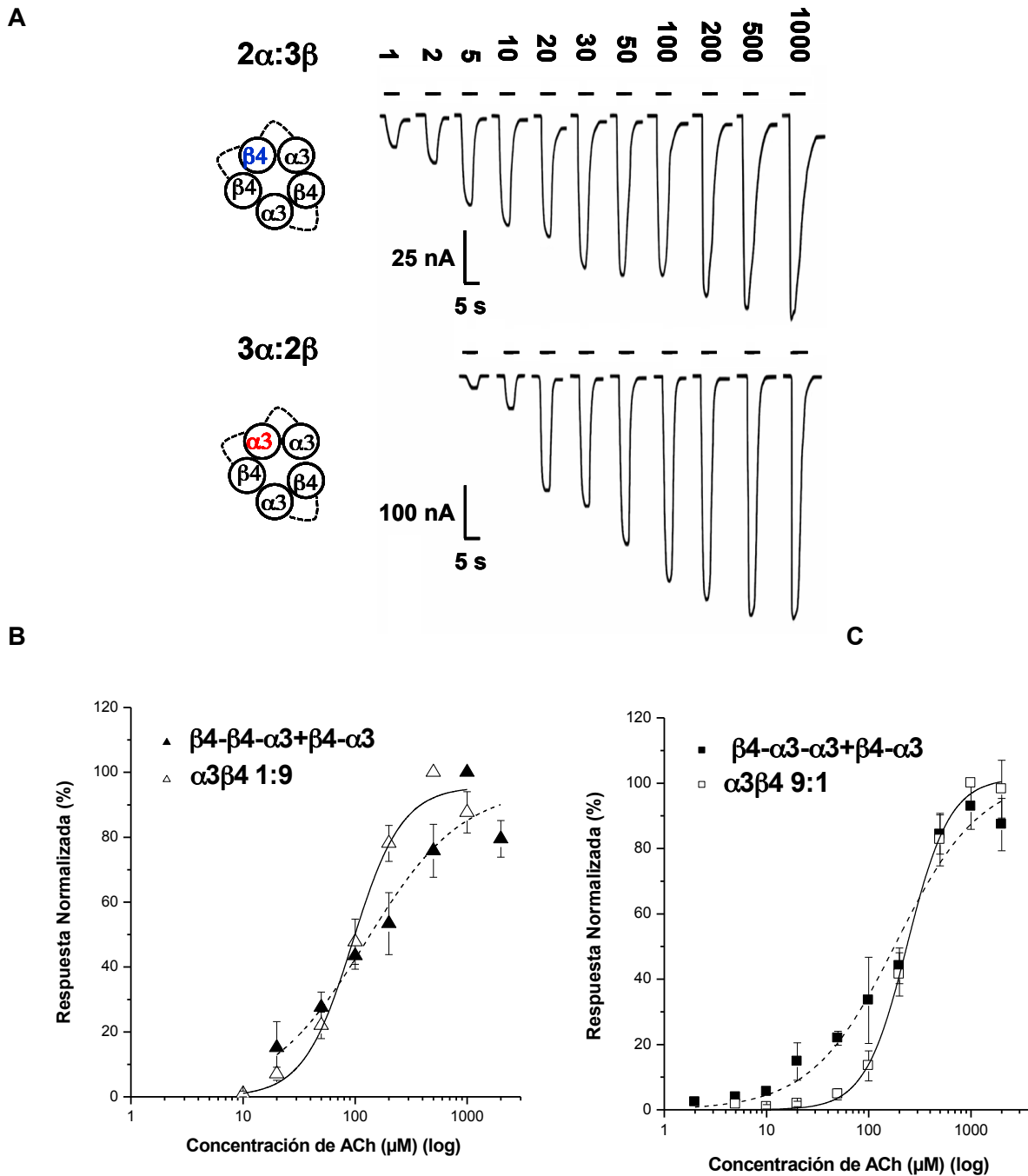


Fig. 42. Los nAChRs $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ humanos expresados a partir de construcciones concatémicas exhiben una sensibilidad a ACh similar a los receptores expresados a partir de subunidades monoméricas. Los trazos en (A) son ejemplos de corrientes de entrada originadas por la aplicación de diferentes concentraciones de ACh (en μ M) y registradas en ovocitos inyectados con la combinación de ARNm $\beta 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ + $\beta 4$ - $\alpha 3$ (arriba) y $\beta 4$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ + $\beta 4$ - $\alpha 3$ (abajo), tal y como se indica en la figura. Las células se mantuvieron a -70 mV. La duración de la aplicación de ACh fue de 5 s, como se indica en la barra superior a cada trazo. Las curvas concentración-respuesta para la ACh (normalizadas respecto a la I_{\max} evocada por ACh 1mM) en ovocitos inyectados con las mencionadas mezclas ($\beta 4$ - $\beta 4$ - $\alpha 3$ + $\beta 4$ - $\alpha 3$ ▲; $\beta 4$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ + $\beta 4$ - $\alpha 3$ ■; líneas discontinuas) se muestran en (B) y (C). Para facilitar la comparación, también se representan las curvas concentración-respuesta a ACh de los receptores formados a partir de subunidades no ligadas (△ para ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 1:9 y □ para ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 9:1). Los datos representados resultan de la media de 4-5 experimentos llevados a cabo en ovocitos procedentes de al menos 3 donadores diferentes.

4.3.2. Los receptores concateméricos funcionales expresados son resultado de la completa incorporación a la membrana de las proteínas de fusión.

Pudiera ocurrir que la incorporación del dímero y/o del trímero al nAChR $\alpha 3\beta 4$ humano ocurriera de forma incompleta o parcial, siendo este problema difícil de detectar tal y como se ha descrito en trabajos previos (Groot-Kormelink y col., 2004). En consecuencia, se estudió si este problema ocurría para los receptores creados a partir de la combinación del dímero con cada trímero y si estos receptores contenían las subunidades correctas, tal y como dictaba el diseño de las construcciones. Para ello se llevaron a cabo una serie de controles, tal y como se detalla a continuación.

En primer lugar, se verificó que el ARNm sintetizado in vitro fuera puro y tuviera la correcta longitud para descartar que se hubiera producido la rotura o degradación del mismo. Es probable que si existe la suficiente contaminación por productos de degradación del ARNm, los receptores funcionales que observamos no se formen a partir de las construcciones concateméricas sino a partir de subunidades monoméricas contaminantes. La evaluación de los ARNm concateméricos mediante geles de electroforesis (ver Fig. 43) mostró que el material genético del que partíamos no poseía impurezas o productos de degradación, ya que el ARNm, tanto dimérico como trimérico (líneas 4, 5 y 6) mostró una única banda limpia con el apropiado peso molecular ($\sim 1,5$ Kb para las subunidades libres, ~ 3 Kb para el dímero y $\sim 4,6$ y $\sim 4,5$ Kb para los trímeros $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3$ y $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3$ respectivamente).

Naturalmente, la degradación del ARNm puede ocurrir en el interior del ovocito tras la inyección o a nivel de proteína, por lo que existe el riesgo de que el esfuerzo realizado para llevar a cabo la unión de las subunidades para fijar su estequiometría y topología dentro del receptor sea en vano. Otro problema añadido es la posibilidad de que el dímero o los trímeros sean capaces de combinarse consigo mismos dando lugar a receptores funcionales erróneos como son los dímeros de pentámeros, produciendo poblaciones de receptores de estequiometría heterogénea. Este ensamblaje incorrecto de las construcciones concateméricas se ha descrito para los dímeros $\alpha 4\text{-}\beta 2$ creados para reproducir las dos estequiometrías del nAChR $\alpha 4\beta 2$ en el grupo de Jon Lindstrom (Zhou y col., 2003) y para otros dímeros creados para reproducir las estequiometrías de otros subtipos de nAChR (Groot-Kormelink y col., 2004). En consecuencia, se estudió si el dímero y los trímeros creados exhibían expresión funcional cuando éstos se inyectaban solos en ovocitos de *Xenopus*. Se realizaron registros electrofisiológicos en presencia de ACh 1mM en estos ovocitos, no observándose respuestas medibles

(n=32 para cada concatémoro, procedentes de al menos 14 donadores distintos, 12-24 ng de ARNm por ovocito). Este resultado indica que estas construcciones en particular no producen ensamblajes erróneos (loops, dímeros de pentámeros...), descartándose también la degradación del ARNm concatémérico o la proteólisis del dímero y trímeros en el interior del ovocito, dando lugar con una alta probabilidad a receptores con una estequiometría homogénea.

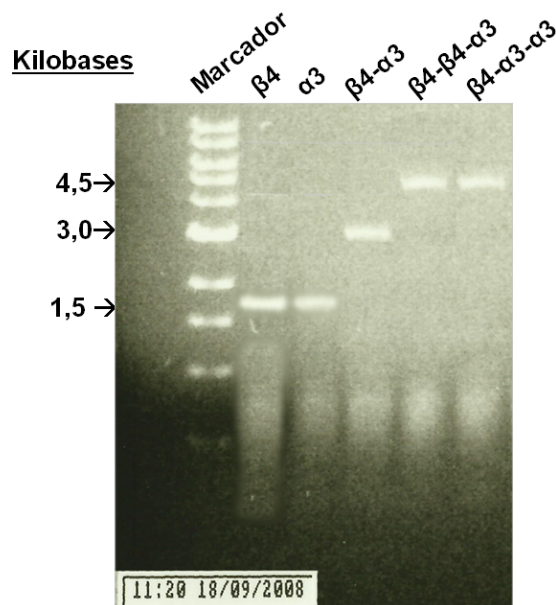


Fig.

43. Gel de electroforesis de ARN para analizar las construcciones concatéméricas de ARNm inyectadas en *Xenopus laevis*. Aproximadamente 500 ng de ARNm de las subunidades $\beta 4$ y $\alpha 3$, del dímero $\beta 4-\alpha 3$ y de los trímeros $\beta 4-\beta 4-\alpha 3$ y $\beta 4-\alpha 3-\alpha 3$ se separaron en un gel de agarosa al 1,5%. El marcador de peso molecular 1kb se muestra a la izquierda del gel. Los tamaños teóricos de los ARNms son 1,5 Kb para las subunidades libres, 3 Kb para el dímero y 4,6 y 4,5 Kb para los trímeros $\beta 4-\beta 4-\alpha 3$ y $\beta 4-\alpha 3-\alpha 3$ respectivamente. Como se observa en el gel los productos de ARNms inyectados no se encontraban degradados.

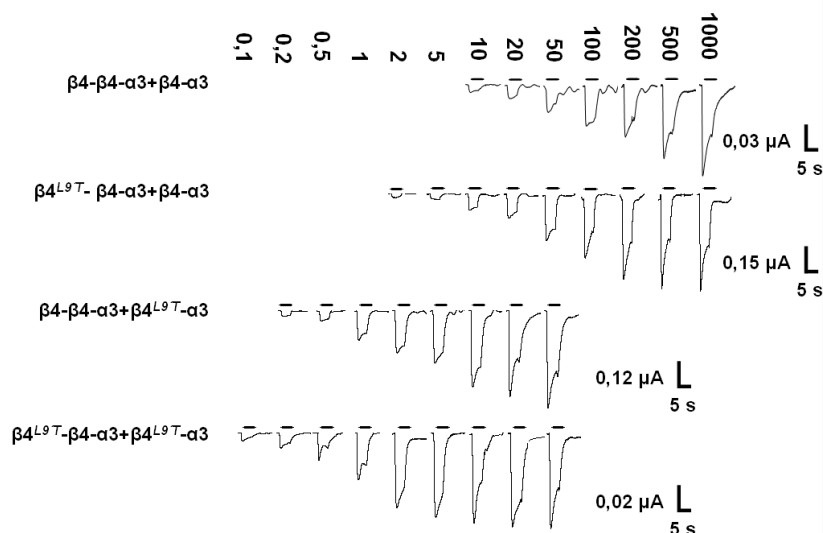
Para corroborar este resultado decidimos idear un test funcional sensible para descartar con seguridad la presencia de productos de degradación y la incorporación incompleta del dímero y/o trímero en el receptor. La aproximación elegida se basa en una mutación reportera utilizada previamente en otros trabajos para el estudio de la estequiometría de los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 4\beta 3$ (Boorman y col., 2000; Groot-Kormelink y col., 2004; Groot-Kormelink y col., 2006): en concreto, la mutación del aminoácido hidrofóbico leucina 9' al residuo hidrofílico treonina (L9'T), presente en el segundo dominio transmembrana del receptor nicotínico. La mutación L9'T en el poro del receptor hace a éste más sensible al agonista (Revah y col., 1991), probablemente por estabilización del estado abierto del canal, lo que se traduce en un retraso en la

desensibilización del receptor y en una disminución de la CE_{50} al agonista, siendo la extensión de esta disminución aproximadamente proporcional al número de subunidades mutantes en el pentámero (Labarca y *col.*, 1995; Chang y *col.*, 1996; Chang y *col.*, 1999).

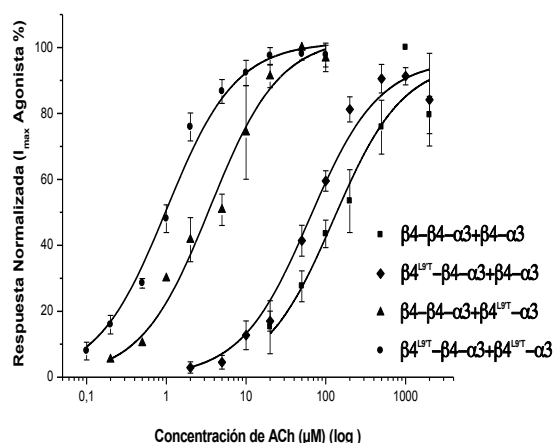
La figura 44.B muestra el efecto de la introducción de la mutación L9^T solo en la primera subunidad $\beta 4$ del trímero $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3$ (♦, tercera curva de izquierda a derecha), solo en la subunidad $\beta 4$ del dímero $\beta 4\text{-}\alpha 3$ (▲, segunda curva de izquierda a derecha) y el efecto de la combinación del trímero y dímero mutantes ya mencionados (doble mutantes) (●, primera curva a la izquierda) en el receptor $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ (■, primera curva a la derecha). La mutación produjo progresivos desplazamientos hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a ACh, siendo el desplazamiento mayor cuando la mutación se expresó en la subunidad $\beta 4$ del dímero que cuando ésta se expresó en el trímero. En consecuencia, se produjo una disminución del valor de la CE_{50} del receptor concatémico silvestre desde $108,43\pm 12,3\text{ }\mu\text{M}$ a los valores de $68,19\pm 8,04\text{ }\mu\text{M}$ en el receptor mutante $\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ ($p<0,05$; t-Test; $n=8$) y de $5,15\pm 1,51\text{ }\mu\text{M}$ en el receptor mutante $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\alpha 3$ ($p<0,01$; t-Test; $n=3$). El máximo efecto se observó cuando tanto el dímero como el trímero portaban la mutación, obteniéndose una CE_{50} de $1,04\pm 0,14\text{ }\mu\text{M}$ en el receptor doble mutante $\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\alpha 3$ ($p<0,001$; t-Test; $n=4$). En la figura 44.C se muestran representadas las mismas curvas concentración respuesta a ACh pertenecientes al receptor $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ silvestre, a los simples mutantes y al doble mutante, pero forzados a tener un $nH=1$ para que estas sean paralelas y el cálculo de las distancias entre las curvas sea más exacto, lo que nos dará la razón de disminución de la CE_{50} en cada caso. En la tabla 10 se muestran los valores de las nuevas CE_{50} calculadas a partir de las curvas concentración respuesta con un $nH=1$, así como las razones de reducción. Vemos como la mutación en la posición 1 del trímero hace que la CE_{50} disminuya dos veces, mientras que la mutación de la subunidad $\beta 4$ del dímero, hace que éste receptor sea más sensible a ACh unas 35 veces. La combinación de ambas mutaciones hace que el receptor aumente su sensibilidad casi en 126 veces, lo que concuerda con las razones de disminución de la CE_{50} a ACh indicadas anteriormente, sugiriendo un efecto multiplicador de las dos mutaciones tal y como se podía deducir de los trabajos de (Labarca y *col.*, 1995; Chang y *col.*, 1996; Boorman y *col.*, 2000). Sin embargo, pudimos observar que el grado de participación de las subunidades en el estado abierto-cerrado del poro iónico no es el mismo para el mismo subtipo de subunidad dentro del receptor pentamérico, oponiéndose nuestros resultados a los descritos por los autores mencionados líneas más arriba. Esta aproximación nos

permitió ver claramente como las subunidades dentro de un mismo receptor no son simétricas, indicando una contribución diferencial de las subunidades $\beta 4$ al “gate” del canal, muy posiblemente debido a su posición dentro del pentámero y a la naturaleza de las subunidades que la acompañan.

A



B



C

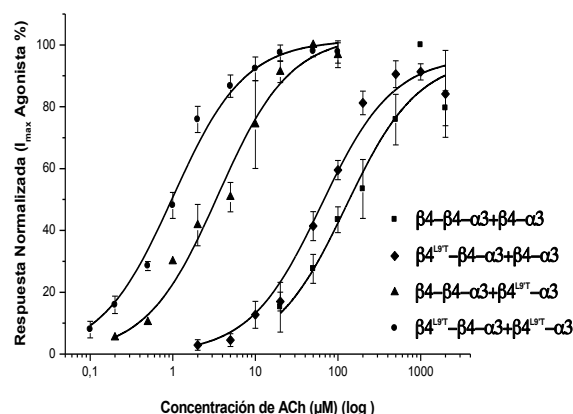


Fig. 44. El efecto de la mutación L9'T en las subunidades $\beta 4$ sobre la sensibilidad a ACh en el receptor $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ concatenado es progresiva y no-equivalente. Los trazos en (A) son ejemplos de corrientes de entrada originadas por la aplicación de diferentes concentraciones de ACh (en μM) y registradas en ovocitos inyectados con las combinaciones indicadas en la figura. Las células se mantuvieron a -70 mV . La duración de la aplicación de ACh fue de 5 s , como se indica en la barra superior a cada trazo. En (B) se muestra la comparación de las curvas concentración-respuesta de los receptores concatenados portadores de la L9'T en una sola subunidad $\beta 4$ del trímero ($\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ ♦), del dímero ($\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\alpha 3$ ▲), o en ambas ($\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9T}}\text{-}\alpha 3$ ●). Las curvas concentración-respuesta en (C) son las mismas que en (B) pero forzadas a tener una misma pendiente igual a 1 para calcular la distancia horizontal entre las curvas y estimar las razones de potencia. Obsérvese que el incremento de la sensibilidad al agonista producido por una sola subunidad $\beta 4$ mutante es mayor si la subunidad mutada está en el dímero. Cuando las dos mutaciones se combinan, sus efectos se multiplican (en la escala logarítmica, los efectos se suman), como se muestra en (B). Los datos representados resultan de la media de 3-8 experimentos llevados a cabo en ovocitos procedentes de al menos 3 donadores diferentes.

TABLA 10. Efecto de la mutación L9'T en subunidades $\beta 4$ diferentes sobre la curva concentración-respuesta a ACh en receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ concatenados expresados en ovocitos de *Xenopus*.

| Ovocitos | CE ₅₀ (μM) (ajuste libre) | I _{max} ACh (nA) | nH | CE ₅₀ (μM) (nH=1) | Razón de potencia | n |
|---|---|---------------------------|-----------|---------------------------------|-------------------|-----|
| $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ | 108,43±12,30 | 85,20±34,07 | 1,09±0,24 | 125,63 | — | 4/3 |
| $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ | 68,19±8,04 | 429,76±104,03 | 1,18±0,1 | 62,68 | 2,00 | 8/3 |
| $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3$ | 5,15±1,51 | 330,0±164,42 | 1,17±0,23 | 3,55 | 35.38 | 3/3 |
| $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3$ | 1,04±0,14 | 122,25±50,71 | 1,29±0,2 | 1 | 125,63 | 4/3 |

CE₅₀, I_{max} y el coeficiente de Hill (nH) son el resultado de la media ± E.M.S del ajuste a la ecuación de Hill de las curvas concentración-respuesta completas obtenidas por ovocito. Las razones de potencia se estimaron a partir de los valores obtenidos de las curvas cuyo ajuste se forzó tener la misma pendiente (Fig. 44.B.), y se expresaron respecto a los receptores con 5 leucinas en la posición 9' (que tendrán una razón de potencia de 1). n es el número de ovocitos analizados procedentes de al menos 3 donadores distintos.

De forma similar, se realizó la caracterización de la integridad del receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ concatémico a partir del uso de las siguientes construcciones mutantes: $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3$ y $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3$. La figura 45.B muestra las curvas concentración respuesta a ACh de los receptores $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ (silvestre) (■, primera curva de la derecha), $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ (♦, tercera curva de izquierda a derecha), $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3$ (▲, segunda curva de izquierda a derecha) y $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3$ (doble mutante) (●, primera curva a la izquierda). Como en el caso anterior, la mutación L9'T en la subunidad $\beta 4$ produjo progresivos desplazamientos hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a ACh, observándose el desplazamiento máximo de la curva cuando la mutación se expresó tanto en la subunidad $\beta 4$ del dímero como del trímero. Así, se produjo una disminución del valor de la CE₅₀ del receptor concatémico silvestre desde 235,24±22,59 μM a los valores de 47,19±7,59 μM en el receptor mutante $\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4\text{-}\alpha 3$ (p<0,001; t-Test; n=4); de 5,65±1,08 μM en el receptor mutante $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{+}\beta 4^{\text{L9'T}}\text{-}\alpha 3$.

$\alpha 3+\beta 4^{L9T}-\alpha 3$ ($p<0,001$; t-Test; $n=6$); y de $1,26\pm 0,10$ μM en el receptor doble mutante $\beta 4^{L9T}-\alpha 3-\alpha 3+\beta 4^{L9T}-\alpha 3$ ($p<0,001$; t-Test; $n=6$). En la figura 45.C y en la tabla 11 se muestran respectivamente las mismas curvas concentración respuesta a ACh con un ajuste del coeficiente de Hill igual a 1 para que éstas sean paralelas, tal y como se hizo en el caso anterior, y los nuevos valores de CE_{50} calculados a partir de las curvas concentración respuesta con un $nH=1$ junto con las razones de reducción. Vemos como la mutación en la subunidad $\beta 4$ del trímero hace que la CE_{50} disminuya unas cuatro veces, mientras que la mutación de la subunidad $\beta 4$ del dímero, hace que éste receptor sea más sensible a ACh unas 43 veces. La combinación de ambas mutaciones hace que el receptor aumente su sensibilidad unas 151 veces, lo que concuerda con el efecto multiplicador de las mutaciones individuales. A su vez, este resultado ratifica de nuevo el hallazgo de la distinta contribución funcional de las subunidades dentro del receptor nicotínico.

Lo que sí es razonable concluir a partir del análisis de estos resultados es que la expresión funcional observada del receptor formado por la combinación del dímero con cada uno de los trímeros es resultado del ensamblaje correcto de los mismos y no producto de la degradación de las construcciones o de la incorporación incompleta de las mismas al receptor, ya que en este último caso se observarían curvas concentración respuesta con dos componentes mostrando la existencia de una población heterogénea de receptores con distinta estequiometría en el mismo ovocito (Groot-Kormelink y *col.*, 2004).

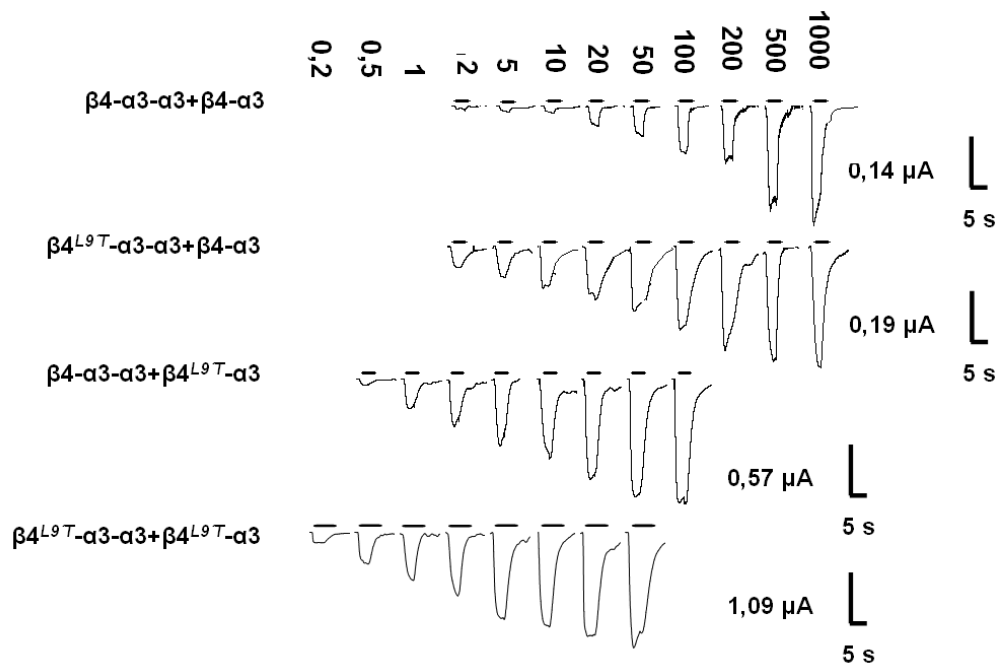
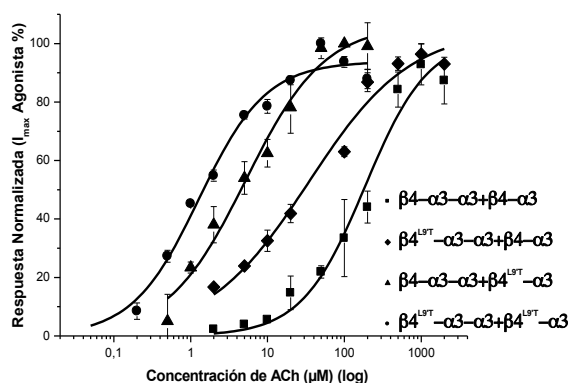
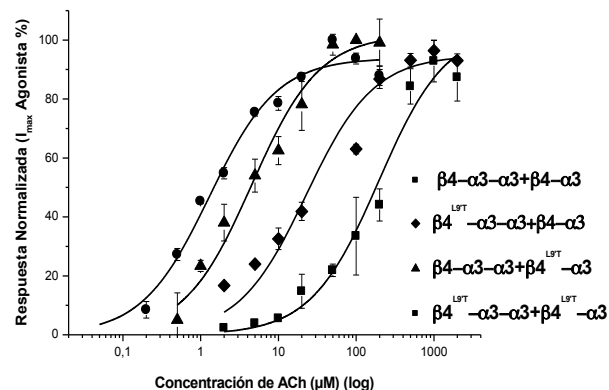
A**B****C**

Fig. 45. En ovocitos que expresan el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ concatenado, el desplazamiento de la sensibilidad al agonista producido por la mutación L9'T depende de la posición de la subunidad $\beta 4$ mutada. Los trazos en (A) son ejemplos de corrientes de entrada originadas por la aplicación de diferentes concentraciones de ACh (en μM) y registradas en ovocitos inyectados con las combinaciones indicadas en la figura. Las células se mantuvieron a -70 mV. La duración de la aplicación de ACh fue de 5 s, como se indica en la barra superior a cada trazo. (B) y (C) muestran las curvas concentración-respuesta a ACh obtenidas de ovocitos inyectados con diferentes mezclas de ARNm: $\beta 4$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ + $\beta 4$ - $\alpha 3$ (■), $\beta 4^{L9T}$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ + $\beta 4$ - $\alpha 3$ (◆), $\beta 4$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ + $\beta 4^{L9T}$ - $\alpha 3$ (▲) o $\beta 4^{L9T}$ - $\alpha 3$ - $\alpha 3$ + $\beta 4^{L9T}$ - $\alpha 3$ (●). Cada respuesta se normalizó respecto al máximo de corriente generada por 1 mM ACh. Los resultados normalizados se ajustaron a la ecuación de Hill mediante un ajuste libre (A) o forzando a tener una misma pendiente igual a 1 (B) para calcular la distancia horizontal entre las curvas y estimar la razón de potencia. Obsérvese el incremento progresivo en la potencia de ACh cuando la mutación L9'T se introdujo en la subunidad $\beta 4$ del trímero, en la subunidad $\beta 4$ del dímero o en ambos. Los datos representados resultan de la media de 4 a 6 experimentos llevados a cabo a partir de ovocitos procedentes de al menos dos donadores distintos.

TABLA 11. Efecto de la mutación L9'T en subunidades $\beta 4$ diferentes sobre la curva concentración-respuesta a ACh en receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ concatenados expresados en ovocitos de *Xenopus*.

| Ovocitos | CE ₅₀ (μM) (ajuste libre) | I _{max} ACh (nA) | nH | CE ₅₀ (μM) (nH=1) | Razón de potencia | n |
|--|---|---------------------------|-----------|------------------------------------|-------------------------|-----|
| $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3$ | 235,24±22,59 | 343,60±7,0 | 1,15±0,06 | 194,69 | — | 5/3 |
| $\beta 4^{L9T}\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3$ | 47,19±7,59 | 469,28±61,0 | 1,08±0,35 | 45,00 | 4,33 | 4/2 |
| $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4^{L9T}\text{-}\alpha 3$ | 5,65±1,08 | 1434,15±456,65 | 1,03±0,17 | 4,54 | 42,88 | 6/2 |
| $\beta 4^{L9T}\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4^{L9T}\text{-}\alpha 3$ | 1,26±0,10 | 2553,99±1262,7 | 1,02±0,04 | 1,29 | 150,92 | 6/2 |

CE₅₀, I_{max} y el coeficiente de Hill (nH) son el resultado de la media ± E.M.S del ajuste a la ecuación de Hill de las curvas concentración-respuesta completas obtenidas por ovocito. Las razones de potencia se estimaron a partir de los valores obtenidos de las curvas cuyo ajuste se forzó tener la misma pendiente (Fig. 27.B.), y se expresaron respecto a los receptores con 5 leucinas en la posición 9' (que tendrán una razón de potencia de 1). n es el número de ovocitos analizados procedentes de al menos 3 donadores distintos.

4.4. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS nAChRs NATIVOS DE LA CÉLULA CROMAFÍN BOVINA

Como hemos comentado en varias ocasiones a lo largo de este trabajo, una de las inquietudes de nuestro grupo es conocer la estequiometría del receptor nicotínico en el modelo celular que viene siendo utilizado de manera rutinaria en nuestro laboratorio. Si bien, el grupo del Dr. Criado ha descrito la existencia de ARNm que codifica para las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 3$, $\beta 4$ y $\alpha 5$ (Criado *et al.*, 1992; García-Guzmán *et al.*, 1995; Campos-Caro *et al.*, 1997), no se ha demostrado aún si todas estas subunidades se asocian para dar lugar a un receptor complejo $\alpha 3\beta 4(\alpha 5)\alpha 7$ o si pueden existir diferentes combinaciones de estas subunidades para formar distintas poblaciones de receptores en la célula cromafín bovina.

Dentro de esta confusión merece especial atención el subtipo de receptor nicotínico $\alpha 7$ puesto que a pesar de que existen datos, tanto en la literatura como en nuestro propio grupo de investigación, de su presencia en la célula cromafín bovina resulta paradójico comprobar que no es posible medir una presencia directa de su papel funcional como receptor homomérico.

Por todo ello, y de forma complementaria al uso de técnicas altamente resolutivas tanto farmacológicas (agonistas y antagonistas selectivos o no, moduladores alostéricos), como técnicas electrofisiológicas (registros de patch clamp) y de biología molecular (inmunocitoquímica, inmunotransferencia e inmunoprecipitación) utilizadas en otros trabajos por nuestro grupo, se quiso emplear en el modelo de la célula cromafín bovina algunas de las herramientas farmacológicas descritas en los apartados anteriores. En concreto se estudió, la sensibilidad a la molécula oxotremorina M y el efecto modulador del ión zinc en las corrientes nicotínicas nativas con el fin de arrojar luz sobre la estequiometría de los receptores nicotínicos presentes en la célula cromafín bovina.

4.4.1. Respuesta de los nAChR nativos de las células cromafines bovinas a oxo-M.

La figura 46.A muestra registros originales representativos de corrientes iónicas, obtenidos en una misma célula cromafín bovina estimulada con pulsos breves de 250 ms de ACh 100 μ M como control y con oxo-M 300 μ M, aplicados a intervalos de 30 s.

La figura 46.B muestra unos registros similares, donde una vez estabilizada la corriente se perfundió el antagonista mecamilamina (10 μ M) durante 3-5 minutos y se evaluó el grado máximo de bloqueo de la corriente (figura 46.C). Como se puede observar, la perfusión de mecamilamina produjo un bloqueo significativo de la corriente nicotínica inducida por oxo-M (% bloqueo_{Mec} = 91,93 \pm 1,43) ($p < 0,001$; t-Test; $n = 8$), lo que pone de manifiesto la naturaleza nicotínica de las corrientes registradas en la CCB generadas por esta molécula.

Se ensayaron distintas concentraciones de oxo-M (trazos no mostrados). En todos los experimentos se aplicó una única concentración de agonista, y la respuesta nicotínica se comparó con la obtenida con 100 μ M de ACh, para evitar diferencias debido a la variabilidad celular.

Como se puede observar en las figuras 46.A. y 46.B., las corrientes a través de los receptores nicotínicos se activaban muy rápidamente y la cinética de inactivación era bastante similar tanto con ACh como con oxo-M, aunque sus eficacias fueron marcadamente diferentes, ya que la corriente máxima inducida por oxo-M (1mM) fue del $35,35 \pm 2,82$ % respecto a la inducida por ACh 100 μ M ($p < 0,001$; t-Test; $n=9$).

En la figura 46.D. se muestran las curvas concentración-respuesta obtenidas con ACh y con oxo-M. Ambos agonistas exhibieron una potencia similar, con una CE_{50} para ACh de $96,58 \pm 13,28$ μ M y de $113,06 \pm 13,22$ μ M para oxo-M ($n=10$ y 9 respectivamente). El dato de potencia relativa que se extrae de estos resultados es de 0,85 (CE_{50} ACh/ CE_{50} oxo-M). Las respuestas normalizadas a ACh y a oxo-M se ajustaron bien a una ecuación sigmoideal de una componente en cada caso, indicando la presencia de un solo tipo de nAChR en la célula cromafín bovina. El coeficiente de Hill resultante en la curva para ACh fue de $1,58 \pm 0,92$, mientras que para la curva para oxo-M resultó ser de $2,75 \pm 0,87$.

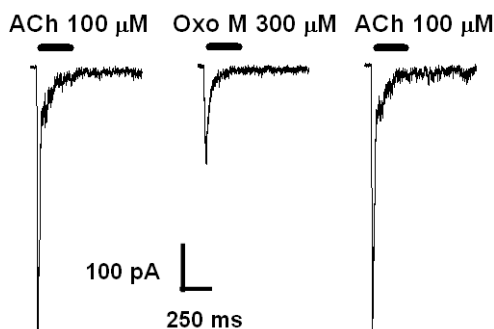
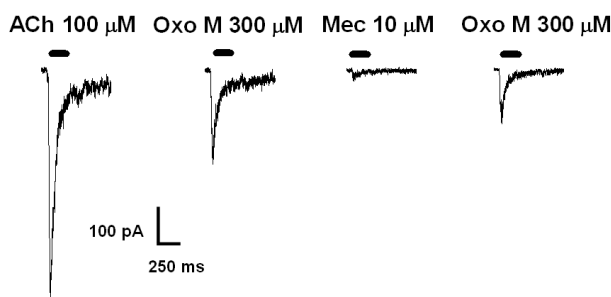
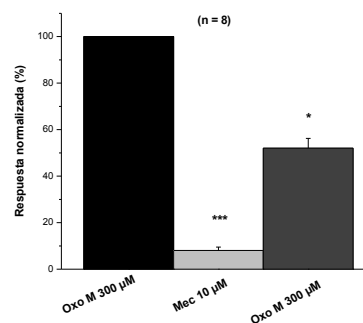
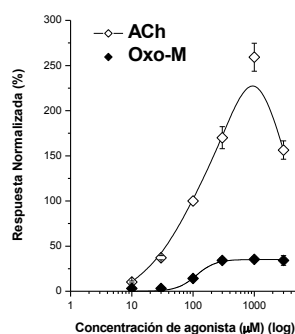
A**B****C****D**

Fig. 46. Efecto de la aplicación de oxo-M sobre los nAChR nativos de la célula cromafin bovina. Los trazos en (A) y (B) muestran registros originales de corrientes de entrada originadas por la aplicación de ACh (100 μ M) y de oxo-M (300 μ M) en ausencia o en presencia del antagonista nicotínico mecamilamina (10 μ M) respectivamente. Las células cromafines bovinas se mantuvieron a -80 mV. La duración de la aplicación de ACh o de oxo-M fue de 250 ms, como se indica en la barra horizontal superior a cada trazo. En (C) se muestran los diagramas de barras que representan las medias de las respuestas observadas en el número de células cromafines bovinas indicado entre paréntesis, normalizadas respecto a 300 μ M de oxo-M \pm E.M.S (* p <0,05 y *** p <0,001, con respecto al control). La figura (D) muestra las curvas concentración-respuesta a ACh y a oxo-M obtenidas de 10 y 9 células cromafines bovinas respectivamente. Cada respuesta se normalizó respecto al máximo de corriente generada por ACh 100 μ M. Los resultados normalizados se ajustaron a la ecuación de Hill.

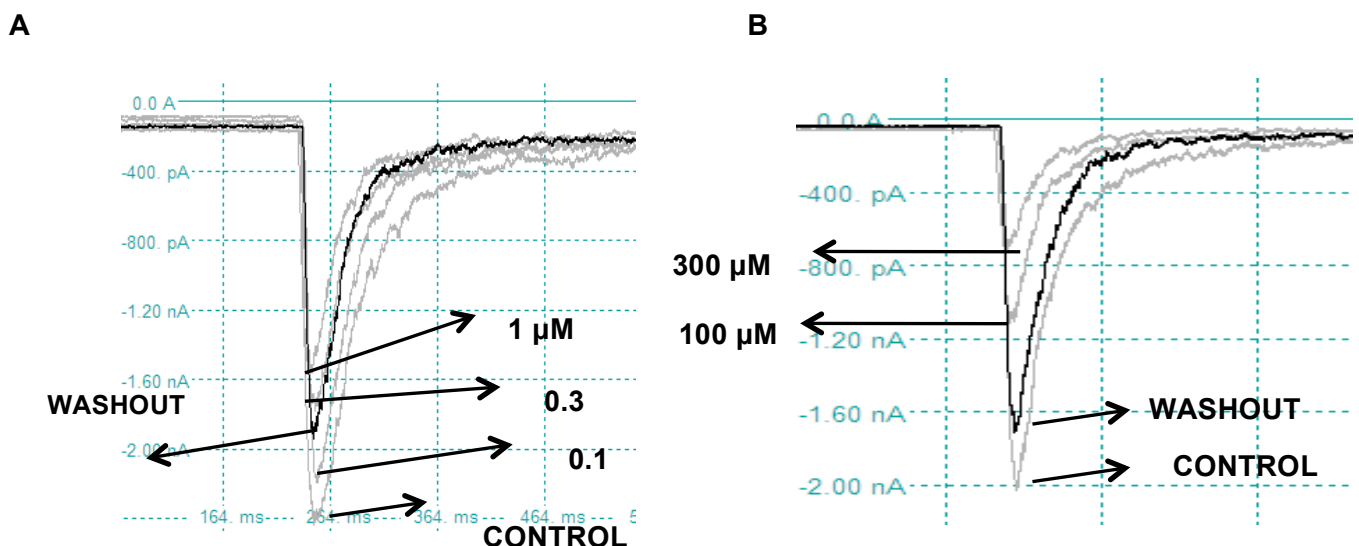
4.4.2. Modulación de los nAChR nativos de la célula cromafin bovina por Zn^{2+} .

Los datos obtenidos en los apartados anteriores en relación con el ión Zn^{2+} , sugieren que éste es capaz de modular positivamente a los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ bovinos expresados en ovocitos de *Xenopus* a concentraciones de 200-500 μM . Una manera efectiva de arrojar luz sobre la estequiometría del receptor nicotínico nativo en la CCB sería comprobar el tipo de modulación ejercida por el Zn^{2+} en este modelo celular.

Como puede apreciarse en la figura 47.A. y B., la perfusión o coaplicación de Zn^{2+} (0,1-300 μM) durante 3-5 minutos junto a la estimulación mediante pulsos breves de 250 ms de ACh 100 μM aplicados a intervalos de 30 s inhibió de forma paulatina la respuesta generada por el agonista nicotínico.

En la figura 47.C. se muestra la curva concentración-respuesta para la inhibición por Zn^{2+} de las respuestas generadas por ACh 100 μM . El Zn^{2+} inhibió la corriente nicotínica con una CI_{50} de $22,0 \pm 7,0$ μM , siendo el máximo bloqueo de la corriente de ACh ejercido por la concentración de 300 μM del ión en estudio.

Adicionalmente se ensayó también el papel modulador del Zn^{2+} en el nAChR nativo de la CCB utilizando ovocitos microtransplantados con membranas de células cromafines, donde hemos observado que la concentración de 500 μM de Zn^{2+} inhibía las corrientes generadas por 1mM de ACh (datos no mostrados). Ante lo tedioso de trabajar con corrientes tan pequeñas no se profundizó más en estos experimentos.



C

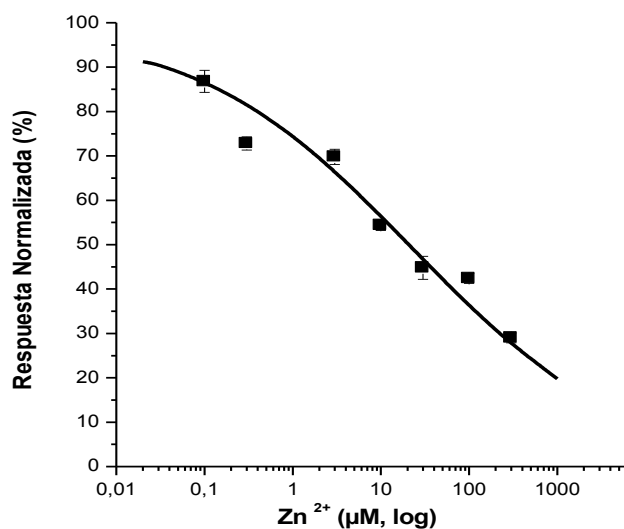


Fig. 47. Efecto de la modulación por Zn^{2+} sobre los nAChR nativos de la célula cromafin bovina. Los trazos en (A) y (B) muestran registros originales de corrientes de entrada originadas por la aplicación de ACh (100 μM) en ausencia (control) o en presencia de distintas concentraciones del ión Zn^{2+} . Las células cromafines bovinas se mantuvieron a -80 mV y la duración de los pulsos de ACh fue de 250 ms. La figura (C) muestra las curvas concentración-respuesta a la inhibición por Zn^{2+} . Cada respuesta obtenida se normalizó respecto al máximo de corriente generada por ACh 100 μM y resultan de la media \pm E.M.S de las corrientes generadas entre 4 a 10 células cromafines bovinas estimuladas con ACh en presencia de concentraciones de Zn^{2+} entre 0,1 a 300 μM . Los resultados normalizados se ajustaron a la ecuación de Hill.

5.-DISCUSIÓN.

En nuestro grupo de trabajo hemos querido determinar la composición en subunidades presente en el receptor nicotínico de la célula cromafín bovina. Partiendo de la confirmación de que esta célula es capaz de expresar ARNm que codifica para las subunidades nicotínicas $\alpha 7$, $\alpha 3$, $\beta 4$ y $\alpha 5$ (Criado y col., 1992; Garcia-Guzman y col., 1995; Campos-Caro y col., 1997), nos planteamos la hipótesis de que en este modelo celular pueda existir un único subtipo de receptor complejo formado por la asociación de todas estas subunidades, o bien, haya diferentes subpoblaciones de receptores, entre los que podría existir receptores $\alpha 7$ homoméricos de forma minoritaria y/o una población de receptores mayoritaria con una estequiometría particular, de características cinéticas y farmacológicas distintas a las estudiadas hasta ahora. Los datos electrofisiológicos y farmacológicos previos no apuntan a la presencia de receptores homoméricos $\alpha 7$. A partir de los datos descritos en el presente trabajo sobre los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ humanos y bovinos expresados en ovocitos, podemos concluir con la misma afirmación que en los estudios previos, abriendo además una nueva posibilidad: la existencia de una estequiometría alternativa para el receptor $\alpha 3\beta 4$. Existe una controversia entre los datos farmacológicos a nivel de corriente unitaria del receptor nicotínico bovino nativo y los obtenidos en receptores bovinos expresados heterológicamente. La polémica continúa sobre esta cuestión. En relación con la hipótesis de si la célula cromafín bovina es capaz de expresar en su membrana un subtipo de receptor homomérico $\alpha 7$ funcional, existen en nuestro grupo datos previos a este trabajo que demuestran que esta subunidad podría coexpresarse junto con otras subunidades presentes en la célula cromafín bovina (Rojo y col., 2007; Escalona y col., 2009). Esta cuestión habría de ser abordada desde otras estrategias metodológicas, que corroboren si esta subunidad es capaz de formar un receptor funcional junto con las subunidades $\alpha 3$ y/o $\beta 4$, que en esta tesis no hemos explorado (o tratado).

El modelo experimental de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* nos permite expresar y estudiar por separado los diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronales que podrían estar presentes en la célula cromafín bovina. Este trabajo se ha centrado en el estudio de nuevas estrategias farmacológicas y electrofisiológicas, con ayuda de la biología molecular para la caracterización de los diferentes subtipos de receptores que se pueden expresar en el ovocito, incorporándose en su membrana de manera eficaz. Así, hemos sido capaces de expresar receptores de los subtipos $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ y, en un segundo plano, los

receptores $\alpha 7$ humanos y bovinos, realizando un estudio sobre su sensibilidad al agonista fisiológico ACh, al agonista colinérgico oxo-M, la modulación de la actividad de estos receptores por el catión zinc y la caracterización de las corrientes de las dos estequiometrías alternativas del receptor $\alpha 3\beta 4$ a nivel de canal único. Además, hemos estudiado el uso de subunidades concatenadas como estrategia para la expresión de receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)$ sin alteración de sus propiedades, aportando una disección más fina y detallada sobre las propiedades y arquitectura de estos receptores.

5.1.-Efecto de la oxotremorina-M sobre los nAChRs $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$.

En el presente trabajo, se estudió el efecto del clásico agonista muscarínico oxo-M sobre los subtipos $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ del nAChR, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Como puede observarse en las figura 20 y 21, la oxo-M indujo corrientes nicotínicas de entrada en el nAChR $\alpha 3\beta 4$, tanto humano como bovino. Las corrientes nicotínicas obtenidas en estos experimentos muestran unas cinéticas de activación e inactivación similares en las dos especies y prácticamente idénticas a las corrientes activadas por la Ach, a pesar de ser ligeramente más desensibilizante en la especie humana. Sin embargo, se observaron marcadas diferencias en cuanto a potencia y eficacia relativas entre ambos agonistas. Cuando se comparó la eficacia de Ach y oxo-M en el receptor $\alpha 3\beta 4$ de las dos especies, encontramos que en los dos casos la Ach fue más eficaz. Este hecho no puede ser explicado por desensibilización del receptor, ya que la cinética de las corrientes obtenidas es similar a las evocadas por la Ach, y a pesar de que la oxo-M sea ligeramente más desensibilizante no explicaría las diferencias en cuanto a amplitud de la corriente. Cuando se comparó la potencia de los dos agonistas en el receptor $\alpha 3\beta 4$ tanto humano como bovino, encontramos que en ambos casos la Ach fue más potente que la oxo-M (2,9 veces más potente en la especie humana y 1,4 veces en la bovina), aunque en la especie bovina la diferencia no fue significativa. A pesar de que el comportamiento de la oxo-M fue similar en las dos especies, nos llama la atención el hecho de que esta molécula actuara de forma menos eficaz y potente en el receptor humano que en el bovino, demostrando la oxo-M una mayor afinidad por esta segunda especie. La explicación a este comportamiento podría deberse a diferencias interespecíficas. A pesar de que las subunidades nicotínicas presentan secuencias muy conservadas y una alta homología entre especies, pequeñas diferencias en la composición en cuanto a aminoácidos en los lugares de unión a los diversos ligandos nicotínicos determina dicha selectividad.

Por ejemplo, mientras que la citosina, un potente agonista de receptores nicotínicos con subunidad $\beta 4$, actúa como tal en rata (Luetje y col., 1991; Papke y col., 1991; Papke y col., 1994), pero en la especie bovina es incapaz de producir ninguna respuesta significativa (Campos-Caro y col., 1997; Maneu y col., 2002)

Por otra parte, cabría la posibilidad de que las respuestas anteriormente descritas se debieran a la activación de receptores muscarínicos nativos de la membrana del ovocito descritos por (Kusano y col., 1982). Sin embargo, el protocolo aplicado ya descarta de por sí ese hecho debido a que la respuesta muscarínica se activa con unos protocolos experimentales más duraderos en el tiempo, siendo esta respuesta rápida característica de una activación nicotínica. Además, esta posibilidad quedó descartada al estimular ovocitos sin inyectar con Ach, oxo-M y dos agonistas muscarínicos, muscarina y metacolina, y no observarse respuestas medibles en ninguno de los casos (figura 22.A), confirmando que nuestras condiciones experimentales eran idóneas para la realización de estos experimentos. La naturaleza nicotínica de las respuestas a oxo-M quedó definitivamente establecida al ser bloqueadas por el antagonista nicotínico mecamilamina y no por el antagonista muscarínico atropina, cuando estas moléculas se ensayaron en los receptores $\alpha 3\beta 4$ humanos (figura 22.C).

La oxo-M se ensayó también en el subtipo de nAChR $\alpha 7$, tanto humano como bovino. Como puede observarse en las figuras 23 y 24 las corrientes nicotínicas obtenidas en estos experimentos presentan una cinética distinta, originada por un retraso en la desensibilización del mismo de unas diez veces en el caso humano. El cálculo de las CE_{50} y de las respuestas máximas relativas para la Ach y la oxo-M nos mostró que ambos agonistas son igual de potentes, aunque la oxo-M resultó ser menos eficaz que la Ach un 55% en el caso humano y un 28% en la especie bovina. Sin embargo, el retraso en la desensibilización del receptor $\alpha 7$ originada por oxo-M provoca un incremento en la entrada de carga iónica a su través (datos no mostrados). Así, aunque la intensidad relativa de la corriente máxima originada por la oxo-M sea menor que la de la originada por la Ach, la carga de la corriente máxima es superior, sugiriendo una mayor eficacia de la oxo-M sobre el receptor $\alpha 7$ humano. El mecanismo por el que se daría el retraso en la desensibilización del receptor se desconoce, siendo necesario un estudio más profundo para su caracterización.

En este caso, la naturaleza de las corrientes nicotínicas generadas por la oxo-M quedó patente al utilizar la molécula PNU 120596, modulador alostérico positivo de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos (Hurst y col., 2005). La eficacia y selectividad del PNU 120596 fue

corroborada al probar sus efectos sobre los nAChR bovinos (datos no mostrados) y humanos $\alpha 7$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. En estos experimentos, el fármaco produjo una potenciación de las respuestas a Ach y oxo-M de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ (figura 25.A). Es de destacar, además, que la potenciación por PNU-120596 en ovocitos de *Xenopus* expresando receptores $\alpha 7$ fue del mismo grado al usar ambos agonistas y se acompaña de un marcado retraso en la inactivación de la corriente nicotínica en ambos casos. Además, este fármaco es capaz de rescatar la funcionalidad de un receptor $\alpha 7$ previamente desensibilizado por un agonista. Al ensayar los efectos del PNU 120596 sobre receptores $\alpha 7$ “estimulados” con los agonistas muscarínicos muscarina y metacolina, y no observarse ningún grado de respuesta ni potenciación, se confirma que las corrientes generadas por oxo-M no son debidas a la activación de posibles receptores muscarínicos presentes en la membrana del ovocito.

Por otro lado, la oxo-M no indujo respuestas medibles cuando se ensayó en ovocitos que expresaban receptores $\alpha 4\beta 2$ en su membrana. Sin embargo, actuó como un antagonista no-competitivo del nAChR $\alpha 4\beta 2$ humano al bloquear las corrientes inducidas por Ach a través de este receptor sin modificar la CE_{50} del agonista fisiológico. Los resultados obtenidos sugieren que este efecto fue concentración-, uso- y voltaje-dependiente. El estudio que realizamos a cerca de la naturaleza de este bloqueo parece indicar que se trataría de un bloqueador de canal abierto (BCA). Los BCA suelen exhibir una inhibición con una marcada voltaje-dependencia (Bertrand y col., 1997). En el caso del bloqueo por oxo-M, vimos que el porcentaje de inhibición de las corrientes generadas por Ach se incrementó a potenciales más negativos, obteniéndose mayores respuestas a potenciales más despolarizados. Por otro lado, nuestra hipótesis de que la oxo-M actúe como un BCA se ve reforzada por el efecto uso-dependiente que parece observarse en el bloqueo de las I_{Ach} . La uso-dependencia del bloqueo por oxo-M indicaría que es necesaria la activación repetitiva del receptor para que esta molécula pudiera acceder a una localización dentro del poro iónico para ejercer su bloqueo máximo. La uso-dependencia de los BCA está descrita por Gurney y Rang, 1984, utilizándose como uno de los criterios para definir a este tipo de bloqueadores.

Que el efecto inhibitorio de la oxo-M sobre el hnAChR $\alpha 4\beta 2$ se produzca mediante un mecanismo de canal abierto, junto con los bajos valores de eficacia calculados para las intensidades de las corrientes generadas por oxo-M en $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$, concuerdan con que la oxo-M se comporte como un agonista parcial del receptor nicotínico. Se sabe que los agonistas parciales producen su máxima respuesta cuando todos los

receptores están ocupados, sin embargo, no son capaces de generar respuestas tan grandes como las respuestas máximas generadas por los agonistas totales. Durante la ocupación del sitio de unión del receptor por el agonista parcial, éste puede competir en la unión de agonistas más activos, reduciendo así las respuestas inducidas por estos últimos. Por lo tanto, este antagonismo sería de tipo competitivo y dependería de las afinidades relativas de los agonistas parciales y totales hacia el receptor, pudiendo el efecto antagonista incrementar la concentración del agonista total para que éste pudiera ejercer su efecto máximo (Stephenson, 1956). Sería necesario realizar experimentos que nos demostraran la naturaleza competitiva del efecto antagonista de la oxo-M en los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ para apoyar nuestra hipótesis de agonismo parcial.

Los resultados del “docking” de la molécula de oxo-M a los distintos subtipos de receptor nicotínico estudiados, apoyarían los resultados farmacológicos sobre el agonismo parcial de dicha molécula sobre los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$. En el caso de los receptores $\alpha 4\beta 2$ los datos son aparentemente contradictorios ya que, en este caso, la oxo-M actuaría como un antagonista no-competitivo y no de tipo competitivo, aunque los experimentos de docking demuestran la posibilidad de esta molécula a unirse al sitio de unión del receptor. Sin embargo, no olvidemos lo que ya comentábamos en la introducción de esta tesis en relación a que muchas sustancias muestran un modo de acción dual, siendo bloqueadores competitivos/no-competitivos, o activadores/bloqueadores, dependiendo de la dosis empleada, el subtipo de receptor, o de la introducción de ciertas mutaciones en el poro del canal (Demuro y *col.*, 2001; Fucile y *col.*, 2002).

Evidencias previas de la acción nicotínica de la oxo-M se describieron por primera vez en la unión neuromuscular (Smith, 1982; Hong y Chang, 1990), en miotubos de embrión de pollo (Hagglblad y *col.*, 1985) y en miocitos de larvas de *Xenopus* (Reitstetter y *col.*, 1994). En el caso de los nAChRs, las primeras evidencias de la acción nicotínica de la oxo-M se describieron en neuronas simpáticas del ganglio celíaco de cobaya (Xian y *col.*, 1994) y en el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ de rata expresado en células HEK 293 (Akk y Auerbach, 1999). En este último trabajo se describe como la oxo-M es capaz de activar a este subtipo de receptor, de forma opuesta a lo observado en nuestros experimentos. Nosotros sugerimos que la discrepancia en los resultados entre ratas y humanos se puede deber a diferencias en la composición de los receptores nicotínicos de especies distintas. A pesar de todo, se sugiere que la acción nicotínica de la oxo-M debe ser considerada a la hora de

utilizarla como herramienta farmacológica en la caracterización funcional de los receptores muscarínicos o a la hora de definir el perfil farmacológico nicotínico-muscarínico mixto de algunos subtipos de nAChR (Shirvan y col., 1991; Elgoyhen y col., 1994), debiendo ser cuidadosamente evaluadas las respuestas generadas por este agonista.

5.2.-Estequiometrías alternativas del nAChR $\alpha 3\beta 4$.

Los resultados presentados en este estudio muestran que la inyección de ovocitos de *Xenopus* con ARNm para las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ del nAChR humano y bovino en las proporciones 1:9 y 9:1 producen poblaciones homogéneas de nAChRs $\alpha 3\beta 4$ que difieren en sus propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y cinéticas. Esto puede explicarse si las subunidades pueden ensamblarse entre sí con una estequiometría diferente en cada población de ovocitos, como describieron Boorman y colaboradores (2000) y, más recientemente, Krashia y col., 2010, Grishin y col., 2010, George y col., 2012 (trabajos publicados posteriormente a la realización de los experimentos de esta tesis). Las dos formas del receptor contienen dos o tres copias de la subunidad $\alpha 3$ en el pentámero, de forma similar a las dos estequiometrías propuestas para el receptor $\alpha 4\beta 2$. Sin embargo, contrario a lo descrito para este receptor, los ovocitos prefieren la estequiometría de dos subunidades α , dado que la forma con mayor sensibilidad a Ach predomina bajo condiciones de igual disponibilidad de subunidades. En ovocitos, el balance entre las dos estequiometrías se puede cambiar alterando la proporción entre las subunidades α y β en la transfección.

La posibilidad de que las propiedades de los receptores nicotínicos neuronales recombinantes sean sensibles a la proporción de subunidades $\alpha:\beta$ transfectadas fue sugerida por primera vez por (Papke y col., 1989; Zwart y col., 1998). La existencia de distintas formas estequiométricas para los receptores nicotínicos neuronales se estableció por primera vez para el receptor $\alpha 4\beta 2$ (Nelson y col., 2003), debido al hecho de que las formas con dos o tres α de esta combinación de subunidades diferían enormemente en su sensibilidad a Ach. La forma con dos subunidades α del receptor $\alpha 4\beta 2$ es hasta 100 veces más sensible a Ach. Aquí describimos un fenómeno similar para la combinación $\alpha 3\beta 4$ y mostramos que puede explicar la heterogeneidad de resultados observados en las propiedades del receptor en distintos sistemas de expresión (Lewis y col., 1997). La hipótesis de que dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$ difieren en su estequiometría se fundamenta principalmente en que solo uno de los dos receptores es susceptible a potenciación por el ión zinc a bajas concentraciones, y a que los dos tipos de receptores muestran marcadas diferencias cinéticas y de conductancia a nivel de canal único.

Las dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$, tanto en la especie humana como en la bovina, difieren en su sensibilidad al agonista fisiológico Ach. Sin embargo, al forzar en ovocitos la expresión de la forma con tres subunidades α mediante la proporción de subunidades 9:1 solo se produce una pequeña disminución de la sensibilidad a Ach (menos de 3 veces en humano y casi 2 veces en bovino vs. 100 veces para el receptor $\alpha 4\beta 2$; (Nelson y col., 2003). Los datos publicados por Krashia y col. 2010 muestran que el rango de potencias a distintos agonistas nicotínicos estándar es similar para la forma con dos y con tres subunidades α , epibatidina>> lobelina> nicotina ~ citisina> Ach> carbacol, en orden descendente de potencia, con la única excepción del DMPP, que es equipotente con la Ach en la forma con dos subunidades α y 10 veces más potente en la forma con tres α . Sin embargo, la utilidad del DMPP como herramienta es probablemente limitada en la práctica, porque el DMPP es más potente en la forma de menor sensibilidad del receptor a Ach lo que reduce la diferencia de potencia en términos absolutos. La extrapolación a valores de CE_{50} sugiere que el DMPP tendría una CE_{50} de 30 y 95 μM en la formas con tres y dos α , respectivamente. En cuanto al agonista colinérgico mixto oxo-M, tampoco sería un buen candidato a la hora de discriminar entre las dos estequiometrías. En términos de eficacia, oxo-M se comporta como un agonista parcial tanto en la forma con dos como en la de tres subunidades α , no observándose diferencias en cuanto a la magnitud de las corrientes en una u otra población de receptores. Si nos fijamos en los valores de potencia relativa a Ach éstos no son muy diferentes en ambas estequiometrías (oxo-M es prácticamente igual de potente a Ach en las dos formas), y su extrapolación a términos absolutos no la hace más interesante (233 μM vs. 274 μM , respectivamente). Es posible que futuras investigaciones puedan encontrar agonistas $\alpha 3\beta 4$ que discriminen mejor entre los dos receptores, ahora que las condiciones para su expresión están definidas. En relación, a esto, en el trabajo de Grishin y col., 2010 se publicó que un isómero de la α -conotoxina AulB, al que se denominó “ribbon” por no poseer hélices alfa en su estructura secundaria, era capaz de discriminar entre las dos estequiometría del receptor $\alpha 3\beta 4$ (en el trabajo denominadas como formas de alta y baja afinidad a Ach), ya que solo inhibía las corrientes activadas en los receptores con baja afinidad. Sin embargo, no hemos encontrado estudios posteriores que utilicen esta molécula para la discriminación entre los dos subtipos de receptor.

Nuestros resultados revelan que el zinc es la mejor herramienta farmacológica hasta ahora encontrada para discriminar entre las dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$. Solo una de las dos estequiometrías, la expresada en ovocitos con proporción 1:9 de subunidades $\alpha:\beta$ exhibe potenciación de las respuestas submáximas a Ach en presencia de bajas

concentraciones de zinc. La hipótesis de que esta forma del receptor $\alpha 3\beta 4$ contenga dos subunidades α concuerda con lo que se sabe acerca de la potenciación por zinc del receptor $\alpha 4\beta 2$, donde este efecto también depende de la estequiometría del receptor (Moroni y col., 2008). En el receptor $\alpha 4\beta 2$, la potenciación por zinc requiere de la interfase $\alpha 4(+)/\alpha 4(-)$, presente solo en la forma con tres subunidades α . Los dos residuos clave de cada lado de la interfase son la His 165 de $\alpha 4$ (Loop F, lado -) y la Glu 194 de $\alpha 4$ (Loop C, lado +) para el receptor humano (Moroni y col., 2008). La cuestión es qué interfase de subunidades media la acción potenciadora del zinc en el receptor $\alpha 3\beta 4$. No podría ser la interfase $\beta 4(+)/\alpha 3(-)$ al estar presente en las dos estequiometrías; y no podría ser tampoco la interfase $\alpha 3(+)/\alpha 3(-)$, presente solo en la forma con tres subunidades α , ya que esta forma no exhibe potenciación por zinc. Además, los residuos clave identificados en la subunidad $\alpha 4$ no están conservados en la subunidad $\alpha 3$ humana o bovina (ver figura 38.C.). Por otro lado, la interfase $\beta 4(+)/\beta 4(-)$ es una buena candidata para mediar este efecto del ión zinc, ya que solo está presente en la estequiometría con dos subunidades α y tiene residuos que podrían coordinar al ión Zn^{2+} . En concreto, la His 165 de la subunidad $\alpha 4$ (lado -) y la Glu 194 de la misma subunidad (lado +) alinean con la Thr 166 (lado -) y con el Asp 195 (lado +) de la subunidad $\beta 4$ humana, respectivamente. Y en la especie bovina con la Met 166 (lado-) y con el Asp 195 (lado +) de la subunidad $\beta 4$. Aunque los aminoácidos treonina y metionina no son conocidos por participar en sitios de coordinación de zinc en metaloproteínas (Auld, 2001), existen varios artículos que muestran que la mutación de residuos de treonina en receptores de glicina y de NMDA eliminan algunos efectos moduladores del ión zinc en estos canales (Laube y col., 2000; Miller y col., 2005; Rachline y col., 2005). En el caso de la metionina, desde un punto de vista químico, la coordinación de este aminoácido al zinc está descrita en la literatura y es posible ya que los grupos NH_2 y COO^- actúan como donadores en la coordinación del metal (Wilson y col. 1977). Por otro lado, se ha descrito que la mutación de una metionina conservada en el sitio de unión a zinc en la familia de metaloproteasas metzincin hace que la actividad enzimática de estas se vea afectada (Hege y col., 2001; Perez y col., 2007), lo que sugiere que este aminoácido participaría de alguna manera en la coordinación con el ión metálico. No obstante, sería necesario realizar estudios de mutagénesis dirigida de estos residuos para confirmar que es la interfase $\beta 4(+)/\beta 4(-)$ la que media la potenciación por Zn^{2+} de los receptores $\alpha 3\beta 4$.

Adicionalmente, las dos formas del receptor $\alpha 3\beta 4$ poseen distintas propiedades a nivel de canal único: difieren de una forma evidente en cuanto a su conductancia y cinética ya que la forma con dos subunidades α abre en ráfagas más duraderas con una menor conductancia que la forma con tres subunidades α (29 vs. 39 pS en humano y

27 vs. 38 pS en bovino). Además, el tipo de aperturas observadas en nuestro trabajo para los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ humanos se parecen a las descritas por Boorman y *col.*, 2003 tras la expresión de receptores $\alpha 3\beta 4$ humanos en proporción 1:1 de subunidades en ovocitos de *Xenopus*, en idénticas condiciones de registro. El valor de conductancia calculado para estos receptores fue de 28,8 pS, observándose aperturas más duraderas (270 ms) en comparación con las presentadas por dicho receptor cuando incorpora la subunidad $\beta 3$ (5,6 ms). Resultados similares a estos publicaron (Krashia y *col.*, 2010), en células HEK293 transfectadas con receptores $\alpha 3\beta 4$ humano, donde observan como la forma con dos α se asemeja al tipo de aperturas observadas mayoritariamente tras la inyección de subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ de rata en proporción 1:1 en ovocitos y en fibroblastos establemente transfectados (Krashia y *col.*, 2010; Lewis y *col.*, 1997; Sivilotti y *col.*, 1997). Por otro lado, en la literatura no se observan canales expresados en ovocitos con las características cinéticas aquí presentadas para los receptores $\alpha 3\beta 4$ con tres subunidades α , pero sí aparecen en células HEK293 transfectadas de forma mayoritaria, y en minoría, en registros realizados en fibroblastos y en otras líneas celulares transfectados con estas subunidades (Krashia y *col.*, 2012; Lewis y *col.*, 1997; Ragozzino y *col.*, 1997). Es este tipo de canal el que más se parece a los receptores nicotínicos neuronales registrados en parches outside-out en el ganglio cervical superior de la rata (Sivilotti y *col.*, 1997), en la célula cromafín bovina (Fenwick y *col.*, 1982; Maconochie y *col.*, 1992; Noone y *col.*, 1992) y en células PC12 (Ifune y *col.*, 1992). Para asegurar la comparabilidad de los valores de conductancia se precisa utilizar soluciones de registro con concentraciones de iones similares, ya que la conductancia de los canales dependen (al menos) de la concentración extracelular de cationes divalentes –por ejemplo, una diferencia en los iones calcio tiene un efecto complejo sobre la conductancia y la cinética de los receptores nicotínicos neuronales (Colquhoun y *col.*, 2003)–. No obstante, pese a no utilizar las mismas condiciones de registros y no haber estimado la duración media de las ráfagas, nuestros resultados son compatibles a las conclusiones de los trabajos mencionados.

Es interesante destacar la diferencia drástica de conductancia y cinética entre las 2 formas del receptor $\alpha 3\beta 4$. Los resultados observados en registros de canal único en el receptor $\alpha 4\beta 2$ implican que el subtipo $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ muestre mayores conductancias que el subtipo $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (Nelson y *col.*, 2003). La inclusión de una determinada quinta subunidad en el receptor además de afectar a la sensibilidad y afinidad frente a agonistas, pueden alterar características mecanicistas, por lo que debe tener algún tipo de efecto sobre la unión de los ligandos. Las diferencias en estequiometría

significan potencialmente cambios en el número de sitios de unión al agonista. Las 140 interfaces $\alpha 3(+)/\beta 4(-)$, donde están localizados los sitios de unión canónicos, se encuentran presentes en las dos isoformas del receptor, siendo poco probable que sean las responsables de las diferencias de conductancia y cinéticas observadas. Sin embargo, la quinta subunidad puede ser o bien $\alpha 3$ o $\beta 4$, lo que conduce a una composición de 140 interfaces entre subunidades diferente en las dos estequiometrías. Como hemos mencionado anteriormente en nuestra discusión sobre la modulación del ión zinc, las 140 interfaces $\alpha 3(+)/\alpha 3(-)$ y $\beta 4(+)/\beta 4(-)$ son específicas de cada subtipo de receptor, por lo que son posibles candidatas para conferir firmas distintivas farmacológicas y electrofisiológicas. Dado que de las dos 140 interfaces, solo $\alpha 3(+)/\alpha 3(-)$ posee las dos cisteínas vecinales en el lazo C y el resto de aminoácidos conservados del componente primario (lado +), es plausible especular que esta interfase funcionase como un tercer sitio de unión al agonista en el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$, una hipótesis que merece ser estudiada, teniendo en cuenta que el nH de la curva concentración-respuesta de la forma con tres subunidades α es mayor, lo que indicaría diferencias de cooperatividad en la unión a los agonistas y/o en los mecanismos acoplados de unión-activación. Los hallazgos realizados por Mazzaferro y *col.*, 2011 y Harpsøe y *col.*, 2011, sugieren que la ocupación por el agonista del sitio en la interfase $\alpha 4(+)/\alpha 4(-)$ contribuye a la activación y apertura del canal a través de un mecanismo mediado por lazo C, y que esta contribución adicional es la causa de la sensibilidad característica de la isoforma $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$. Estos resultados apoyan la existencia de sitios de unión no canónicos en los receptores nicotínicos, que pueden afectar las características de los mismos tratadas aquí.

Además, los receptores nicotínicos son canales catiónicos y sus conductancias a nivel de canal únicos se controlan por tres anillos de residuos cargados del dominio M2 que forma el poro (Imoto y *col.*, 1988) y por residuos de la hélice antipática del lazo M3-M4 (Peters y *col.*, 2005). Así, la quinta subunidad es determinante para la carga del poro. Las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ difieren en la carga del residuo 20' del anillo externo del dominio transmembrana M2 (Glu y Lys, respectivamente). Esto significa que la forma con dos subunidades α posee una carga positiva total (+1) en este anillo y que la forma con tres subunidades α posee una carga neta negativa (-1). En el subtipo muscular, la carga total del anillo es de +2, lo que conlleva a una disminución de la conductancia del canal (aproximadamente de un 20%) (Imoto y *col.*, 1988). Estas subunidades difieren también en la hélice intracelular anfipática. En la posición 4', $\alpha 3$ posee un residuo de Gln y $\beta 4$ un Asp; y en la posición 0' $\alpha 3$ presenta un residuo de Lys mientras que $\beta 4$ presenta una Gln. Estas diferencias sin embargo, darían lugar a un efecto opuesto a los de los residuos del dominio M2 a nivel de conductancia, por lo

que nuestros resultados sugerirían que los residuos del dominio M2 tiene un efecto mayor.

En cuanto a la abundancia relativa de las dos formas del receptor en ovocitos $\alpha 3\beta 4$ 1:1, merece la pena hacer una breve discusión. Cuando el receptor $\alpha 4\beta 2$ se expresa en ovocitos mediante una proporción 1:1 de subunidades $\alpha:\beta$, los receptores resultantes son una mezcla de formas con dos y tres α , predominando los canales de baja sensibilidad a Ach (con tres subunidades α), y son responsables del 75% de la corriente total independientemente del sistema de expresión heteróloga (Nelson y *col.*, 2003; Broadbent y *col.*, 2006; Moroni y *col.*, 2006). Esto se deduce a partir de la curva concentración-respuesta a Ach en estos ovocitos, ya que ajusta mejor a una sigmoide con dos componentes. Cabe la posibilidad de que los canales $\alpha 3\beta 4$ expresados mediante una proporción 1:1 de subunidades $\alpha:\beta$ en ovocitos sean también una mezcla de las dos estequiometrías. Sin embargo, no se puede hacer una estimación directa de la proporción de las dos formas a partir de las curvas concentración-respuesta, debido a la pequeña diferencia en sensibilidad a Ach entre las dos formas (menos de 3 veces para los receptores humanos y casi 2 veces para los bovinos), por lo que es difícil distinguir dos componentes en la curva concentración-respuesta a este agonista en ovocitos 1:1. No obstante, es probable que la forma con dos α sea más abundante en estos ovocitos, ya que producen canales con características idénticas a los receptores expresados en ovocitos 1:9 en cuanto a valores de EC_{50} (Tablas 8 y 9), potenciación por zinc (Hsiao y *col.*, 2001) y conductancia y cinética a nivel de canal único (Boorman y *col.*, 2003).

Es difícil saber porqué $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ difieren tanto en sus comportamientos. Los receptores $\alpha 4\beta 2$ con tres subunidades α predominan cuando se transfectan en una proporción 1:1 de subunidades $\alpha:\beta$ (Nelson y *col.*, 2003; Broadbent y *col.*, 2006; Moroni y *col.*, 2006). Contrariamente a esto, los receptores $\alpha 3\beta 4$ que se forman a partir de una proporción 1:1 de subunidades $\alpha:\beta$ son en su mayoría la forma con dos subunidades $\alpha 3$ en ovocitos, y con tres subunidades en células *HEK293* (Krashia y *col.*, 2010). Se ha descrito que la proporción de las dos formas del receptor $\alpha 4\beta 2$ se afecta por la unión de la chaperona 14-3-3 a la secuencia consenso RSLSV del dominio intracelular de la subunidad α , y que esta unión puede modularse por fosforilación por la proteína cinasa A (PKA), mutación o polimorfismo en un residuo específico de serina (Kim y *col.*, 2003; Exley y *col.*, 2006). Sin embargo, se desconoce si este mecanismo interviene en la regulación de la expresión del receptor $\alpha 3\beta 4$ y de otros nAChRs. Aunque el resto de subunidades nicotínicas posee residuos de serina, (sitios de fosforilación de la PKA), no poseen el motivo de unión para la chaperona 14-

3-3 encontrado en la subunidad $\alpha 4$. Esto podría sugerir que las diferencias de expresión halladas se podrían deber a diferencias entre las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ en su unión a chaperonas.

5.3.-Efecto de la oxotremorina-M y modulación por zinc de los nAChRs nativos de la célula cromafín bovina.

Con la intención de profundizar en el conocimiento de la estequiometría del receptor nicotínico de las células cromafines bovinas, éstas se estimularon con el agonista colinérgico oxo-M, una vez ya descrito su comportamiento sobre distintos tipos de receptores nicotínicos y sobre las distintas poblaciones de nAChRs $\alpha 3\beta 4$ estudiadas en el presente trabajo. Como puede observarse en la figura 46, la oxo-M indujo corrientes nicotínicas de entrada en el nAChR de la célula cromafín bovina. Las corrientes nicotínicas obtenidas en estos experimentos muestran unas cinéticas de activación e inactivación prácticamente idénticas a las corrientes activadas por la ACh. Sin embargo, se observaron marcadas diferencias en cuanto a la eficacia de ambos agonistas, la corriente máxima alcanzada por la oxo-M fue aproximadamente de un 35% respecto a la corriente originada por ACh 100 μ M, que es prácticamente la CE_{50} del agonista fisiológico para el receptor nativo según nuestros datos. Si comparamos con el resultado de eficacia de oxo-M en cualquiera de las tres poblaciones de ovocitos $\alpha 3\beta 4$ bovino (1:9, 1:1 y 9:1), cuyo valor estaba entre el 33 y 35% de la $I_{m\acute{a}x}$ ACh, observamos que la eficacia de esta molécula por el receptor de la célula cromafín bovina sería unas dos veces menor que para el receptor $\alpha 3\beta 4$ expresado en ovocitos. Si comparamos también con la eficacia de la oxo-M en receptores $\alpha 7$ bovinos donde fue mucho mayor ($I/I_{m\acute{a}x}$ ACh \approx 72%), las diferencias son aún más evidentes, sugiriendo una estequiometría distinta para el receptor nativo.

Cuando se comparó la potencia de los dos agonistas, encontramos que ACh fue ligeramente más potente que la oxo-M (CE_{50} ACh/ CE_{50} oxo-M = 0,85), aunque la diferencia no fue significativa. Este resultado concuerda con los datos obtenidos para los receptores $\alpha 3\beta 4$ bovinos expresados en ovocitos donde las potencias relativas fueron cercanas a la unidad (CE_{50} ACh/ CE_{50} oxo-M \sim 1) siendo, por otro lado, claramente diferentes a lo observado para el receptor $\alpha 7$ bovino donde la potencia de la oxo-M fue casi el doble de la de ACh (CE_{50} ACh/ CE_{50} oxo-M = 1,7). Se descartaría una vez más la presencia de un receptor homomérico $\alpha 7$ en la superficie de la CCB.

Para descartar la posibilidad de que las respuestas anteriormente descritas se debieran a la activación de receptores muscarínicos nativos de la membrana de la célula cromafín descritos por Artalejo, 1995, y Olivos y Artalejo, 2008. Sin embargo, el protocolo aplicado ya descarta de por sí ese hecho debido a que la respuesta

muscarínica se activa con unos protocolos experimentales más duraderos en el tiempo, siendo esta respuesta rápida característica de una activación nicotínica. Además, la naturaleza nicotínica de las respuestas a oxo-M quedó confirmada al ser bloqueadas por el antagonista nicotínico mecamilamina (figura 46.B.).

Sería interesante comparar el perfil de potencias de otros agonistas de la célula cromafín bovina con el de las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$. El perfil de potencias de agonistas para la CCB obtenida en nuestro grupo en trabajos previos es $\text{Epib} > \text{Lob} > \text{DMPP}$, $\text{Nic} \geq \text{Cyt} > \text{ACh}$, en orden descendente de potencia (Rojo y col., 2007), siendo compatible con los resultados presentados por Tachikawa y col., 2001; y Free y col., 2003, en la célula cromafín bovina, encontrando en este último trabajo, un perfil de potencias similar en células *HEK293* transfectadas con las subunidades $\alpha 3\beta 4$ en proporción 1:1 de la especie bovina. Presumiblemente la estequiometría del receptor expresado mayoritariamente en las células *HEK293* era $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ (Krashia y col. 2010). Sin embargo, las diferencias encontradas en la constante de disociación de algunas de los agonistas y antagonistas probados, entre los receptores nativos y los expresados heterológamente sugieren que la estequiometría del receptor nicotínico de la célula cromafín es otra. Conclusiones similares encontramos en el trabajo de Krashia y col., 2010, donde comparan el rango de potencias a distintos agonistas nicotínicos estándar entre la forma con dos y tres subunidades α del receptor $\alpha 3\beta 4$, con el de receptores del soma de neuronas de ganglios autónomos, detectando diferencias en la secuencia de potencias. Nuestra propia experiencia nos indica, tras comparar rangos de potencia de agonistas publicados para receptores $\alpha 3\beta 4$ expresados en distintos sistemas de expresión, con los obtenidos para la CCB y otros receptores ganglionares, que el uso de agonistas nicotínicos no es de mucha utilidad para el análisis de las subunidades de los receptores nativos.

Los experimentos de modulación del ión zinc en el receptor nicotínico de la célula cromafín bovina nos ofrecen información reveladora. Como puede apreciarse en la figura 47.A. y B., distintas concentraciones de zinc (de 0,1 a 300 μM) inhibieron las corrientes originadas por ACh 100 μM , hasta un máximo del 71%. Como ya habíamos visto en los receptores $\alpha 3\beta 4$ expresados en ovocitos, el ión Zn^{2+} también inhibía las corrientes a ACh en receptores $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ y, contrariamente, era capaz de potenciar las respuestas submáximas a ACh en la estequiometría $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ del receptor bovino, en el rango de concentraciones de 0,2 a 1 mM del ión. Esta potenciación se ejercería presumiblemente través de un sitio de modulación en la interfase $\beta 4(+)/\beta 4(-)$, conferida por la presencia de la quinta subunidad $\beta 4$, y que no está presente en el receptor con estequiometría $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$, tal y como ya hemos discutido en este trabajo. Estos

resultados descartarían por tanto, la presencia de una quinta subunidad $\beta 4$ en la estequiometría del receptor nicotínico nativo de la célula cromafín.

Aunque la modulación del ión zinc en el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ bovino puede ser similar a la observada en la célula cromafín, no podemos concluir que la estequiometría del receptor nativo sea compatible a un receptor con tres subunidades $\alpha 3$. Los valores de Cl_{50} del Zn^{2+} son muy diferentes entre ambos receptores: en el receptor nativo el valor es de 22 μM , frente al 1,37 mM en el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ humano expresado en ovocitos 9:1. Aunque el valor de Cl_{50} del ión zinc no se calculó para el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ bovino, auspiciamos un valor similar al de su homólogo humano al estudiar el grado de bloqueo ejercido por las concentraciones 0,2, 0,5 y 2 mM de zinc (20%, 32% y 58% de bloqueo respectivamente). Nos inclinamos a pensar que esta gran diferencia se debe a que la quinta subunidad del receptor nativo $\alpha 3\beta 4^*$ no es la $\alpha 3$.

El hallazgo de ARNm de la subunidad $\alpha 5$ en la célula cromafín bovina (Campos-Caro y col., 1997) sugiere que dicha subunidad se expresa en el nAChR adrenal. La coexpresión de la subunidad $\alpha 5$ junto con las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ se ha demostrado mediante estudios de inmunoprecipitación, donde se observa como $\alpha 5$ co-precipita con las otras dos subunidades en ganglio ciliar de rata (Vernallis, Conroy y Berg., 1993). Estudios en sistemas de expresión heteróloga han constatado que la subunidad $\alpha 5$ forma receptores funcionales cuando se ensambla con las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ (Wang y col., 1996, Campos-Caro., 1997). Además, se ha sugerido que la subunidad $\alpha 5$ compite con la subunidad en la formación del receptor $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ (Frahm y col., 2011; Gahring y col., 2010), hecho demostrado por George y col., 2012 al construir un concatémoro con la estequiometría $(\alpha 3\beta 4)_2\alpha 5$ y que recreaba las propiedades farmacológicas de los receptores $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ expresados en ovocitos a través de la coinyección de subunidades individuales.

Sin embargo, la comparación de los nAChRs $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ expresados en ovocitos muestran pequeñas diferencias en su afinidad por los mismos agonistas (Gerzanich y col., 1998, Free y col., 2003 y George y col. 2012), lo que sugiere que si la subunidad $\alpha 5$ está presente en el receptor nativo de la CCB, no contribuye significativamente en su farmacología. Por otro lado, Sivilotti y col., 1997, demostraron que la conductancia de los receptores $\alpha 3\beta 4$ recombinantes se incrementaba con la incorporación de la subunidad $\alpha 5$ en el receptor, asemejándose a las propiedades a nivel de canal único de los receptores nativos de los ganglios simpáticos y de las células cromafines bovinas. Esto ocurría solo en una minoría de canales $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ de rata expresados en ovocitos, lo que sugiere que en estos ovocitos existían dos poblaciones de canales:

una mayoritaria $\alpha 3\beta 4$ y una minoritaria $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ nAChRs. Las condiciones de expresión y las proporciones de subunidades inyectadas no se especifican en el estudio.

Adicionalmente, se ha descrito la presencia de subunidades $\alpha 7$ en la célula cromafín bovina, y la inyección de su ARNm en ovocitos de *Xenopus* produce receptores homoméricos funcionales (García-Guzmán y col., 1995). Sin embargo, en los últimos años se han publicado varios trabajos que muestran evidencias de la expresión de receptores heteroméricos que contienen la subunidad $\alpha 7$. De esta forma, se ha descrito el co-ensamblaje de subunidades $\alpha 7$ del nAChR junto con otras como $\alpha 5$, $\beta 2$, $\beta 3$ ó $\beta 4$, para dar lugar a receptores funcionales en sistemas de expresión heteróloga (Yu y Role, 1998a; Yu y Role, 1998b; Girod y col., 1999; Palma y col., 1999; Khiroug y col., 2002; Millar, 2003; Criado y col., 2012; datos propios no mostrados). Más recientemente, se ha sugerido la expresión de receptores heteroméricos nativos de este tipo en células PC12 (Virginio y col., 2002), en neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal de ratón (Liu y col., 2009) e incluso, en la célula cromafín bovina (El-Hajj y col., 2007; Escalona y col., 2009).

Todos estos estudios sugieren que la combinación de subunidades del nAChR asociado con la secreción de catecolaminas en la célula cromafín bovina estimulada por agonistas nicotínicos sea $\alpha 3\beta 4\alpha 7(\alpha 5)$.

Una aproximación muy apropiada para acometer este estudio sería la utilización de subunidades ligadas (concatémicos) ya que de esta manera podríamos controlar la composición de subunidades del receptor formado en sistemas de expresión heteróloga y comparar, de esta manera, sus características farmacológicas y electrofisiológicas con las del receptor nativo.

5.4.-Efecto de la concatenación de las subunidades α y β en las propiedades funcionales del receptor $\alpha 3\beta 4$.

Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo y en otros previos, se encuentran dificultades a la hora de analizar los datos experimentales procedentes del estudio de canales iónicos activados por ligando de estequiometría heteromérica expresados en sistemas heterólogos debido a la posibilidad de formación de mezclas heterogéneas de receptores dado a que se producen diferentes reorganizaciones de subunidades que resultan funcionales. El receptor $\alpha 4\beta 2$ es el claro ejemplo de canal activado por ligando, cuya caracterización en sistemas de expresión heteróloga resultó difícil debido a la variedad de subtipos de receptores que se podían formar (Zwart y col., 1998; Nelson y col., 2003; Zhou y col., 2003; Lopez-Hernandez y col., 2004; Moroni y col.,

2006). Una aproximación que solventa este problema es la expresión de receptores con una estequiometría fija obtenida a través de la concatenación de las subunidades en un orden y composición predefinidos.

En el presente trabajo, y antes de acometer el estudio de un receptor heteromérico complejo $\alpha 3\beta 4\alpha 7(\alpha 5)$, intentamos recrear las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$ mediante la creación de concatémeros. Una vez validada la funcionalidad y viabilidad de los mismos, incorporaríamos las subunidades adicionales. Para forzar la expresión homogénea de las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$, se siguió una estrategia basada en los datos publicados por Groot-Kormelink y colaboradores (2006) y por Carbone y colaboradores en 2009. Las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ se unieron a nivel de ADN para formar construcciones diméricas y triméricas que se combinan entre sí para dar lugar al receptor pentamérico. Siguiendo la metodología descrita por el grupo de Erwin Sigel sobre la concatenación de las subunidades del receptor GABA_A (Baumann y col., 2001; Baumann y col., 2002; Baumann y col., 2003), las subunidades se unieron por medio de elementos enlazadores formados por repeticiones de glutamina-alanina-prolina de longitud fija, eliminándose el péptido señal en todos los casos excepto para la primera subunidad del trímero y del dímero. La presencia del péptido señal en todas las subunidades de un receptor concatenado puede originar efectos proteolíticos indeseados y afectar la inserción de la proteína en la membrana del ovocito. Además, la impredecible estructura secundaria de la secuencia del elemento enlazador conteniendo el péptido señal podría originar cambios en la conformación del receptor (Baumann y col., 2001; Minier y col., 2004; Baur y col., 2006).

Como hemos podido constatar, la metodología utilizada aquí para la concatenación de las subunidades dio lugar con éxito a la construcción de receptores concatenados con expresión funcional. En primer lugar, nos aseguramos que los receptores estaban formados según nuestro diseño, es decir, que cada receptor estaba formado por un trímero y un dímero de subunidades ligadas y no eran producto de la incorporación de subunidades producidas por la degradación total o parcial de los concatémeros a nivel de ARNm o proteína y posterior ensamblaje de los mismos, problemas ya descritos en la literatura (Nicke y col., 2003; (Nicke y col., 2003; Zhou y col., 2003; Groot-Kormelink y col., 2004). Para ello utilizamos dímeros y trímeros con la mutación L9'T en una subunidad $\beta 4$. El incremento de la sensibilidad a ACh del receptor al incorporar una de las construcciones mutadas y el efecto sinérgico multiplicador observado al incorporar ambas mutaciones demuestran que el receptor funcional formado es el resultado del ensamblaje de trímeros con dímeros. Sin embargo, no podemos descartar que se produzca la degradación de los dímeros y trímeros en monómeros y su posterior

reensamblaje, aunque parece que no se producirían suficientes subunidades de este tipo para formar receptores funcionales a un nivel medible.

Las propiedades funcionales de los nAChRs concatémicos fueron similares a las de sus homólogos formados por las subunidades no ligadas, sugiriendo que la ligación de las subunidades no distorsiona significativamente la estructura de los receptores. Sin embargo, los niveles de expresión fueron marcada y significativamente menores en los receptores concatémicos que en los receptores formados por subunidades no ligadas. Concentraciones máximas de ACh indujeron respuestas de amplitud promedio de $4,67 \pm 1,64 \mu\text{A}$ y de $3,91 \pm 0,95 \mu\text{A}$ en ovocitos que expresaban respectivamente los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ formados por subunidades no concatenadas humanas. En comparación, se registraron corrientes de menor magnitud después de 3 a 4 días tras la inyección del doble de la cantidad de ARNm normalmente inyectada (24 ng para los concatémicos versus 11,5 ng para las subunidades no ligadas). Para que la concatenación de las subunidades sea un modelo válido para el estudio de la función y estructura de receptores con estequiometría definidas, el nivel de expresión deseable de los receptores concatémicos debería ser comparable al de los receptores formados a partir de subunidades libres tras la inyección de ovocitos de *Xenopus* con similares cantidades de ARNm (Baur y col., 2006). Sin embargo, hasta el momento de la realización de nuestros experimentos los mejores resultados se han obtenido en la concatenación de las subunidades para el receptor $\alpha 4\beta 2$ humano, donde se alcanzaron niveles de expresión comparables entre los receptores concatenados y los formados a partir de los monómeros no ligados tras la inyección de aproximadamente 5 veces la cantidad normal utilizada de ARNm (Carbone y col., 2009). En el presente trabajo los niveles de expresión de los receptores concatenados se redujeron en un 98 y en un 90% para los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$, respectivamente. Sin embargo, la cantidad de ARNm concatenado utilizado fue solo el doble a la cantidad normal utilizada para las subunidades no ligadas, lo que auspicia que si se aumentara la cantidad de ARNm concatémico inyectado obtendríamos corrientes de mayor magnitud. Esto, unido a que la magnitud de las corrientes obtenidas con los receptores concatémicos en nuestros experimentos han sido suficientes para evaluar la funcionalidad de los mismos, hace apropiado el uso de las construcciones creadas para el estudio rutinario de los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$.

Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, lo ideal sería que con la inyección de cantidad comparables de ARNm se obtuvieran los mismos resultados a nivel de corrientes. En trabajos previos, las pequeñas amplitudes de las corrientes generadas

en respuesta a agonista en receptores concatenados podían achacarse a factores tales como la presencia del péptido señal o a la naturaleza y longitud de los elementos que enlazan las subunidades. Sin embargo, en nuestro caso la menor magnitud de las corrientes no se debe a posibles procesos proteolíticos o a conformaciones tridimensionales erróneas debido a la presencia de los péptidos señal ya que estos se eliminaron del elemento enlazador excepto para la primera subunidad de los trímeros o dímero, constatándose la integridad de los receptores concatémicos mediante el test funcional con los mutantes L9'T. Otras causas más probables son que la eficacia de la traducción a proteína, el tráfico intracelular o la inserción en la membrana celular se reduzca para los receptores concatémicos. Las causas de esta reducción en la expresión no están claras. Pudiera ser que el orden de las subunidades impuesto a nivel de ADN en el concatémico afectara a la asociación de las mismas durante el proceso de ensamblaje natural del receptor, es decir, que el orden de subunidades propuesto no facilitara las interacciones que las subunidades que conducen al ensamblaje y maduración de los receptores $\alpha 3\beta 4$ pentaméricos. Poco se conoce acerca de los pasos elementales que gobiernan el ensamblaje de los complejos pentaméricos del nAChR. Por analogía al ensamblaje del nAChR muscular (Green y *col.*, 1993), es probable que las subunidades se incorporen al pentámero a través de pasos secuenciales dirigidos por interacciones subunidad-subunidad o subunidad-chaperona. Además, cuando estas interacciones se dificultan, que podría ocurrir si las subunidades no estuvieran orientadas adecuadamente o no adquirieran una estructura tridimensional apropiada, la oligomerización y/o maduración pueden ser ineficientes, produciendo un bajo nivel de expresión o receptores con funciones alteradas. Asimismo, como se ha demostrado para los receptores GABA_A, el orden de incorporación de las subunidades (incluso para estequiometrías idénticas) puede afectar la función del receptor (Baur y *col.*, 2006). Es interesante comparar los niveles de expresión de los concatémicos pentaméricos para los receptores $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ de los trabajos de Groot-Kormelink y *col.*, 2006 y Carbone y *col.*, 2009 respectivamente. El orden de subunidades empleadas en el primer trabajo, $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3$, aunque produce receptores funcionales da lugar a unos niveles de expresión bajos en comparación con los receptores $\alpha 3\beta 4$ formados por subunidades no ligadas. Sin embargo, el orden de subunidades empleado por Carbone y *col.*, 2009, $\beta 2\text{-}\alpha 4\text{-}\beta 2\text{-}\alpha 4\text{-}\beta 2$, da lugar a unos resultados muy satisfactorios como ya hemos comentado. Esto sugiere que el posicionamiento de las interfases $\beta\text{-}\alpha$ previamente a la subunidad β o α podría ser una buena estrategia para la producción de concatémicos con una buena expresión funcional. Sin embargo, en el trabajo reciente de (George y *col.*, 2012), donde utilizan el orden de subunidades propuesto por el grupo de Carbone en un

intento de crear concatémoros pentaméricos para las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$, no consiguen recrear las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ formados a través de la inyección de proporciones extremas de ARNm de las subunidades en ovocitos de *Xenopus*. No obstante, con el diseño propuesto en el presente trabajo hemos conseguido recrear con bastante fidelidad la sensibilidad al agonista ACh de las dos estequiometrías, datos que han sido corroborados posteriormente a la realización de nuestros experimentos por .(Stokes y col.), con el uso de dímeros $\beta 4$ - $\alpha 3$ y coinyección con subunidades $\alpha 3$ o $\beta 4$ del nAChR para expresar las dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$. La farmacología del agonista ACh observada en este estudio concuerda con nuestros resultados.

Una estrategia para mejorar el nivel de expresión de las construcciones concatémicas utilizado por algunos grupos (George y col. 2012) es modificar la secuencia de ADN codificante para las subunidades de manera que obtengamos una secuencia de nucleótidos optimizada para su expresión en sistemas de expresión de vertebrados. La optimización incluye minimización de altos contenidos de GC en segmentos de la secuencia de ADN, mejora del uso de codones, predicción y reducción de la formación de estructuras secundarias en el ARNm y la eliminación de secuencias repetidas y posibles codones de inicio alternativo y sitios de “empalme” alternativo (alternative splicing).

En cuanto a la funcionalidad de nuestros receptores concatémicos, a pesar de reproducir los valores de potencia de ACh de los receptores $\alpha 3\beta 4$ formados a partir de subunidades no ligadas, la mera medida de la EC_{50} a agonistas no es del todo suficiente para comparar los receptores concatenados con los formados por subunidades libres. Serían necesarios experimentos más robustos para confirmar la integridad de los AChBS formados y así validar nuestro modelo, como puede ser la medida del desplazamiento de las curvas concentración respuesta producidas por un antagonista competitivo (Groot-Kormelink y col., 2006) o el estudio de la modulación por Zn^{2+} de las dos poblaciones de receptores concatémicos.

Una línea experimental importante que abre la técnica de los concatémoros es la posibilidad de introducir un número de subunidades mutantes definido en un receptor y elegir la localización de esas mutaciones.

5.5.-Efecto de la incorporación subunidades $\beta 4$ L9'T en los concatémeros del receptor $\alpha 3\beta 4$.

Esta aproximación se usó con el objetivo de comprobar la integridad de nuestros concatémeros, sin embargo, nos ha otorgado un hallazgo adicional. Nos ha permitido comprobar como las subunidades dentro de un mismo receptor no son simétricas, indicando una contribución diferencial de las subunidades $\beta 4$ al “gate” del canal, muy posiblemente debido a su posición dentro del receptor y a la naturaleza del resto de subunidades que lo forman.

En las figuras 44.B y 45.B se muestra el efecto de la introducción de la mutación L9'T solo en la primera subunidad $\beta 4$ de los trímeros $\beta 4\text{-}\beta 4\text{-}\alpha 3$ y $\beta 4\text{-}\alpha 3\text{-}\alpha 3$, solo en la subunidad $\beta 4$ del dímero $\beta 4\text{-}\alpha 3$ y el efecto de la combinación del dímero con cada trímero (doble mutantes). La mutación produjo progresivos desplazamientos hacia la izquierda de la curva concentración-respuesta a ACh, siendo el desplazamiento mayor cuando la mutación se expresó en la subunidad $\beta 4$ del dímero que cuando ésta se expresó en el trímero. El efecto máximo se observó cuando tanto el dímero como el trímero portaban la mutación, sugiriendo un efecto multiplicador de las dos mutaciones tal y como se podía deducir de los trabajos de (Labarca y col., 1995; Chang y col., 1996; Boorman y col., 2000). Sin embargo, pudimos observar que el grado de participación de las subunidades en el estado abierto-cerrado del poro iónico no es el mismo para el mismo tipo de subunidad dentro del receptor pentamérico, contrastando nuestros resultados a los descritos por los autores mencionados.

Nuestros resultados contrastan con los de Boorman y col., 2000, donde concluyen que el efecto de la mutación es independiente de la subunidad que la porte sino que se debe al número de subunidades mutadas. Sin embargo, debido a sus condiciones de expresión no pueden comprobar la contribución de un tipo subunidad mutada de forma individual, ya que al no utilizar subunidades concatenadas solo pueden observar el efecto global de la mutación o bien de todas las subunidades $\alpha 3$ o de todas las subunidades $\beta 4$ incorporadas en el receptor, asumiendo que cada subunidad tiene un efecto similar, independientemente de su naturaleza. Nuestros resultados contradicen estas conclusiones. No obstante, los trabajos en el receptor GABA_A apoyan nuestros resultados al observar que el efecto de la introducción de la mutación L9'S en el receptor $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ de la subunidad que la porte.

Esta aproximación junto con los resultados anteriormente discutidos en esta Tesis nos permitió ver claramente como las subunidades dentro de un mismo receptor no son simétricas, indicando una contribución diferencial de las subunidades a las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas del canal, muy posiblemente debido a

su posición dentro del pentámero y a la naturaleza de las subunidades que la acompañan.

En la presente Tesis hemos definido las condiciones de expresión que favorecen la formación de receptores recombinantes con la estequiometría lo más parecida posible a los receptores nativo, y hemos sentado las bases para futuros estudios sobre sus propiedades funcionales. Será importante asegurar mediante futuros trabajos si los receptores nativos puede existir en distintas estequiometrías y si esto tiene consecuencias farmacológicas y fisiológicas.

6.-CONCLUSIONES

A raíz de los resultados obtenidos en este trabajo experimental, podemos alcanzar las siguientes conclusiones:

1. La oxotremorina M se comporta como un agonista nicotínico parcial de los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ humanos y bovinos, y como un bloqueador de canal abierto de los receptores $\alpha 4\beta 2$ humanos, expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.
2. El receptor nicotínico neuronal $\alpha 3\beta 4$ puede existir en dos estequiometrías alternativas que se diferencian en su sensibilidad a ACh, modulación por el ión Zn^{2+} , valor de conductancia del canal y cinética de las corrientes a nivel de canal único. La expresión del receptor de estequiometría $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ es favorecida en el sistema de expresión heteróloga de *Xenopus laevis*.
3. Se propone a la interfase $\beta 4(+)/\beta 4(-)$ como candidata para mediar el efecto modulador del ión zinc en la $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ del nAChR.
4. Se propone a la interfase $\alpha 3(+)/\alpha 3(-)$ como portadora de un tercer sitio de unión al agonista de baja afinidad en el receptor $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$, que le conferiría su firma distintiva farmacológica y cinética.
5. La estrategia seguida para la concatenación de las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ en dímeros y trímeros para la expresión de receptores $\alpha 3\beta 4$ con estequiometrías alternativas, da lugar a receptores funcionales que reproducen bien la sensibilidad a ACh de los mismos, aunque se hace necesario un mayor número de controles para comprobar sus características farmacológicas y electrofisiológicas y/o mejoras de las construcciones para incrementar su nivel de expresión.
6. El efecto multiplicador de la mutación L9'T de las subunidades $\beta 4$ sobre la sensibilidad a ACh de los receptores concatémicos se produce por a una contribución individual diferencial de cada subunidad mutada, que posiblemente se deba a su posición dentro del pentámero y a la naturaleza de las subunidades que la acompañan. Las subunidades dentro de un mismo receptor no son simétricas.
7. Se descartan las estequiometrías $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ y $(\alpha 3)_3(\beta 4)_2$ para el nAChR de la célula cromafín bovina, considerándose probable que el receptor nicotínico

nativo presente en este modelo celular podría estar formando por una combinación de subunidades $\alpha 3\beta 4\alpha 7(\alpha 5)$.

Creemos que los resultados obtenidos en este trabajo podrían tener implicaciones bajo diferentes puntos de vista:

- Desde el punto de científico, proporcionan nuevas aportaciones para el esclarecimiento de la composición y estructura del receptor nicotínico presente en la célula cromafin bovina que viene siendo objeto de estudio en este grupo.
- Desde el punto de clínico, las consecuencias funcionales que conlleva la existencia de dos estequiometrías del receptor $\alpha 3\beta 4$, puede aportar un nuevo camino hacia la búsqueda de las implicaciones fisiológicas, así como patológicas, de este receptor.
- Desde el punto de vista de la industria farmacéutica, estos resultados plantean una estrategia significativa para abordar la caracterización de familia de receptores con lazo Cys en general: la búsqueda de nuevos fármacos cuya diana sería una subpoblación de receptores específica, mediante compuestos que se unan a la interfase de subunidades diferencial presente en el subtipo de interés.

7.-REFERENCIAS

- AFAR, R., TRIFARO, J.M. y QUIK, M. (1993). Modulation of nicotinic acetylcholine receptor function in bovine adrenal chromaffin cells by thymopentin. *Brain Res*, **606**, 346-50.
- AKABAS, M.H., KAUFMANN, C., ARCHDEACON, P. y KARLIN, A. (1994). Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron*, **13**, 919-27.
- AKK, G. y AUERBACH, A. (1999). Activation of muscle nicotinic acetylcholine receptor channels by nicotinic and muscarinic agonists. *Br J Pharmacol*, **128**, 1467-76.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., ALKONDON, M. y ROGERS, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, **89**, 73-120.
- ALBUQUERQUE, E.X., PEREIRA, E.F., BONFANTE-CABARCAS, R., MARCHIORO, M., MATSUBAYASHI, H., ALKONDON, M. y MAELICKE, A. (1996). Nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal neurons: cell compartment-specific expression and modulatory control of channel activity. *Prog Brain Res*, **109**, 111-24.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F. y ALBUQUERQUE, E.X. (1998). alpha-bungarotoxin- and methyllycaconitine-sensitive nicotinic receptors mediate fast synaptic transmission in interneurons of rat hippocampal slices. *Brain Res*, **810**, 257-63.
- ALKONDON, M., PEREIRA, E.F., WONNACOTT, S. y ALBUQUERQUE, E.X. (1992). Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllycaconitine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol Pharmacol*, **41**, 802-8.
- ANAND, R. y LINDSTROM, J. (1992). Chromosomal localization of seven neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in humans. *Genomics*, **13**, 962-7.
- ANAND, R., PENG, X., BALLESTA, J.J. y LINDSTROM, J. (1993). Pharmacological characterization of alpha-bungarotoxin-sensitive acetylcholine receptors immunisolated from chick retina: contrasting properties of alpha 7 and alpha 8 subunit-containing subtypes. *Mol Pharmacol*, **44**, 1046-50.
- ARIAS, H.R. (1998). Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta*, **1376**, 173-220.
- ARIAS, H.R. (1999). Role of local anesthetics on both cholinergic and serotonergic ionotropic receptors. *Neurosci Biobehav Rev*, **23**, 817-43.
- ARIAS, H.R., MCCARDY, E.A., GALLAGHER, M.J. y BLANTON, M.P. (2001). Interaction of barbiturate analogs with the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *Mol Pharmacol*, **60**, 497-506.
- AULD, D.S. (2001). Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*, **14**, 271-313.
- AZAM, L., WINZER-SERHAN, U. y LESLIE, F.M. (2003). Co-expression of alpha7 and beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within rat brain cholinergic neurons. *Neuroscience*, **119**, 965-77.

- BADIO, B., GARRAFFO, H.M., PLUMMER, C.V., PADGETT, W.L. y DALY, J.W. (1997). Synthesis and nicotinic activity of epiboxidine: an isoxazole analogue of epibatidine. *Eur J Pharmacol*, **321**, 189-94.
- BAKER, E.R., ZWART, R., SHER, E. y MILLAR, N.S. (2004). Pharmacological properties of alpha 9 alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors revealed by heterologous expression of subunit chimeras. *Mol Pharmacol*, **65**, 453-60.
- BALESTRA, B., VAILATI, S., MORETTI, M., HANKE, W., CLEMENTI, F. y GOTTI, C. (2000). Chick optic lobe contains a developmentally regulated alpha2alpha5beta2 nicotinic receptor subtype. *Mol Pharmacol*, **58**, 300-11.
- BARTOS, M., PRICE, K.L., LUMMIS, S.C. y BOUZAT, C. (2009). Glutamine 57 at the complementary binding site face is a key determinant of morantel selectivity for {alpha}7 nicotinic receptors. *J Biol Chem*, **284**, 21478-87.
- BAUMANN, S.W., BAUR, R. y SIGEL, E. (2001). Subunit arrangement of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem*, **276**, 36275-80.
- BAUMANN, S.W., BAUR, R. y SIGEL, E. (2002). Forced subunit assembly in alpha1beta2gamma2 GABAA receptors. Insight into the absolute arrangement. *J Biol Chem*, **277**, 46020-5.
- BAUMANN, S.W., BAUR, R. y SIGEL, E. (2003). Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci*, **23**, 11158-66.
- BAUR, R., MINIER, F. y SIGEL, E. (2006). A GABA(A) receptor of defined subunit composition and positioning: concatenation of five subunits. *FEBS Lett*, **580**, 1616-20.
- BEATO, M., GROOT-KORMELINK, P.J., COLQUHOUN, D. y SIVILOTTI, L.G. (2004). The activation mechanism of alpha1 homomeric glycine receptors. *J Neurosci*, **24**, 895-906.
- BEBBINGTON, A., BRIMBLECOMBE, R.W. y SHAKESHAFT, D. (1966). The central and peripheral activity of acetylenic amines related to oxotremorine. *Br J Pharmacol Chemother*, **26**, 56-67.
- BEECH, D.J., BERNHEIM, L., MATHIE, A. y HILLE, B. (1991). Intracellular Ca²⁺ buffers disrupt muscarinic suppression of Ca²⁺ current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 652-6.
- BERTRAND, D., BUISSON, B., KRAUSE, R.M., HU, H.Y. y BERTRAND, S. (1997). Electrophysiology: a method to investigate the functional properties of ligand-gated channels. *J Recept Signal Transduct Res*, **17**, 227-42.
- BERTRAND, D., DEVILLERS-THIERY, A., REVAH, F., GALZI, J.L., HUSSY, N., MULLE, C., BERTRAND, S., BALLIVET, M. y CHANGEUX, J.P. (1992). Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1261-5.
- BERTRAND, D., GALZI, J.L., DEVILLERS-THIERY, A., BERTRAND, S. y CHANGEUX, J.P. (1993). Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6971-5.
- BIRDSALL, N.J., BURGEN, A.S. y HULME, E.C. (1978). The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, **14**, 723-36.
- BLONDEL, A., SANGER, D.J. y MOSER, P.C. (2000). Characterisation of the effects of nicotine in the five-choice serial reaction time task in rats: antagonist studies. *Psychopharmacology (Berl)*, **149**, 293-305.

- BLOUNT, P. y MERLIE, J.P. (1989). Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, **3**, 349-57.
- BOND, R.A. y GIRDLESTONE, D. (1996). Romancing receptor research at Verona classification meeting. *Trends Pharmacol Sci*, **17**, 85-9.
- BOORMAN, J.P., BEATO, M., GROOT-KORMELINK, P.J., BROADBENT, S.D. y SIVILOTTI, L.G. (2003). The effects of beta3 subunit incorporation on the pharmacology and single channel properties of oocyte-expressed human alpha3beta4 neuronal nicotinic receptors. *J Biol Chem*, **278**, 44033-40.
- BOORMAN, J.P., GROOT-KORMELINK, P.J. y SIVILOTTI, L.G. (2000). Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the b3 subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, **529 Pt 3**, 565-77.
- BORDIA, T., GRADY, S.R., MCINTOSH, J.M. y QUIK, M. (2007). Nigrostriatal damage preferentially decreases a subpopulation of alpha6beta2* nAChRs in mouse, monkey, and Parkinson's disease striatum. *Mol Pharmacol*, **72**, 52-61.
- BOULTER, J., EVANS, K., GOLDMAN, D., MARTIN, G., TRECO, D., HEINEMANN, S. y PATRICK, J. (1986). Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature*, **319**, 368-74.
- BOULTER, J., O'SHEA-GREENFIELD, A., DUVOISIN, R.M., CONNOLLY, J.G., WADA, E., JENSEN, A., GARDNER, P.D., BALLIVET, M., DENERIS, E.S., MCKINNON, D. y ET AL. (1990). Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J Biol Chem*, **265**, 4472-82.
- BOUZAT, C., GUMILAR, F., SPITZMAUL, G., WANG, H.L., RAYES, D., HANSEN, S.B., TAYLOR, P. y SINE, S.M. (2004). Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature*, **430**, 896-900.
- BREJC, K., VAN DIJK, W.J., KLAASSEN, R.V., SCHUURMANS, M., VAN DER OOST, J., SMIT, A.B. y SIXMA, T.K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, **411**, 269-76.
- BROAD, L.M., ZWART, R., PEARSON, K.H., LEE, M., WALLACE, L., MCPHIE, G.I., EMKEY, R., HOLLINSHEAD, S.P., DELL, C.P., BAKER, S.R. y SHER, E. (2006). Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators. *J Pharmacol Exp Ther*, **318**, 1108-17.
- BROADBENT, S., GROOT-KORMELINK, P.J., KRASHIA, P.A., HARKNESS, P.C., MILLAR, N.S., BEATO, M. y SIVILOTTI, L.G. (2006). Incorporation of the beta3 subunit has a dominant-negative effect on the function of recombinant central-type neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, **70**, 1350-7.
- BROWN, R.W., COLLINS, A.C., LINDSTROM, J.M. y WHITEAKER, P. (2007). Nicotinic alpha5 subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem*, **103**, 204-15.
- BRUSSAARD, A.B., YANG, X., DOYLE, J.P., HUCK, S. y ROLE, L.W. (1994). Developmental regulation of multiple nicotinic AChR channel subtypes in embryonic chick habenula neurons: contributions of both the alpha 2 and alpha 4 subunit genes. *Pflugers Arch*, **429**, 27-43.
- BUISSON, B. y BERTRAND, D. (1998). Allosteric modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol Paris*, **92**, 89-100.

- BURZOMATO, V., BEATO, M., GROOT-KORMELINK, P.J., COLQUHOUN, D. y SIVILOTTI, L.G. (2004). Single-channel behavior of heteromeric $\alpha 1\beta$ glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens. *J Neurosci*, **24**, 10924-40.
- BUTT, C.M., HUTTON, S.R., MARKS, M.J. y COLLINS, A.C. (2002). Bovine serum albumin enhances nicotinic acetylcholine receptor function in mouse thalamic synaptosomes. *J Neurochem*, **83**, 48-56.
- CAMPOS-CARO, A., SMILLIE, F.I., DOMINGUEZ DEL TORO, E., ROVIRA, J.C., VICENTE-AGULLO, F., CHAPULI, J., JUIZ, J.M., SALA, S., SALA, F., BALLESTA, J.J. y CRIADO, M. (1997). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J Neurochem*, **68**, 488-97.
- CARBONE, A.L., MORONI, M., GROOT-KORMELINK, P.J. y BERMUDEZ, I. (2009). Pentameric concatenated $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ and $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ nicotinic acetylcholine receptors: subunit arrangement determines functional expression. *Br J Pharmacol*, **156**, 970-81.
- CARDOSO, R.A., BROZOWSKI, S.J., CHAVEZ-NORIEGA, L.E., HARPOLD, M., VALENZUELA, C.F. y HARRIS, R.A. (1999). Effects of ethanol on recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 774-80.
- CARTIER, G.E., YOSHIKAMI, D., GRAY, W.R., LUO, S., OLIVERA, B.M. y MCINTOSH, J.M. (1996). A new α -conotoxin which targets $\alpha 3\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, **271**, 7522-8.
- CELIE, P.H., KASHEVEROV, I.E., MORDVINTSEV, D.Y., HOGG, R.C., VAN NIEROP, P., VAN ELK, R., VAN ROSSUM-FIKKERT, S.E., ZHMAK, M.N., BERTRAND, D., TSETLIN, V., SIXMA, T.K. y SMIT, A.B. (2005). Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an α -conotoxin PnIA variant. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 582-8.
- CELIE, P.H., VAN ROSSUM-FIKKERT, S.E., VAN DIJK, W.J., BREJC, K., SMIT, A.B. y SIXMA, T.K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron*, **41**, 907-14.
- CLAPHAM, D.E. y NEHER, E. (1984). Substance P reduces acetylcholine-induced currents in isolated bovine chromaffin cells. *J Physiol*, **347**, 255-77.
- CLARKE, P.B. (1993). Nicotinic receptors in mammalian brain: localization and relation to cholinergic innervation. *Prog Brain Res*, **98**, 77-83.
- CLARKE, P.B. y REUBEN, M. (1996). Release of $[3H]$ -noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal $[3H]$ -dopamine release. *Br J Pharmacol*, **117**, 595-606.
- CLEMENTI, F., FORNASARI, D. y GOTTI, C. (2000). Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol*, **393**, 3-10.
- COHEN, B.N., LABARCA, C., DAVIDSON, N. y LESTER, H.A. (1992). Mutations in M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations. *J Gen Physiol*, **100**, 373-400.
- COLQUHOUN, D., HATTON, C.J. y HAWKES, A.G. (2003). The quality of maximum likelihood estimates of ion channel rate constants. *J Physiol*, **547**, 699-728.
- COLQUHOUN, D. y SAKMANN, B. (1981). Fluctuations in the microsecond time range of the current through single acetylcholine receptor ion channels. *Nature*, **294**, 464-6.

- COLQUHOUN, D. y SAKMANN, B. (1985). Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol*, **369**, 501-57.
- COLQUHOUN, D. y SAKMANN, B. (1998). From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron*, **20**, 381-7.
- COMBI, R., DALPRA, L., TENCHINI, M.L. y FERINI-STRAMBI, L. (2004). Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy--a critical overview. *J Neurol*, **251**, 923-34.
- CONROY, W.G. y BERG, D.K. (1995). Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem*, **270**, 4424-31.
- CONROY, W.G. y BERG, D.K. (1999). Rapsyn variants in ciliary ganglia and their possible effects on clustering of nicotinic receptors. *J Neurochem*, **73**, 1399-408.
- CONROY, W.G., LIU, Q.S., NAI, Q., MARGIOTTA, J.F. y BERG, D.K. (2003). Potentiation of $\alpha 7$ -containing nicotinic acetylcholine receptors by select albumins. *Mol Pharmacol*, **63**, 419-28.
- CORDERO-ERAUSQUIN, M., MARUBIO, L.M., KLINK, R. y CHANGEUX, J.P. (2000). Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 211-7.
- CORRADI, J., GUMILAR, F. y BOUZAT, C. (2009). Single-channel kinetic analysis for activation and desensitization of homomeric 5-HT(3)A receptors. *Biophys J*, **97**, 1335-45.
- CORRINGER, P.J., GALZI, J.L., EISELE, J.L., BERTRAND, S., CHANGEUX, J.P. y BERTRAND, D. (1995). Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic $\alpha 7$ homooligomeric receptor. *J Biol Chem*, **270**, 11749-52.
- CORRINGER, P.J., LE NOVERE, N. y CHANGEUX, J.P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 431-58.
- CORRIVEAU, R.A. y BERG, D.K. (1993). Coexpression of multiple acetylcholine receptor genes in neurons: quantification of transcripts during development. *J Neurosci*, **13**, 2662-71.
- COURT, J.A., PIGGOTT, M.A., LLOYD, S., COOKSON, N., BALLARD, C.G., MCKEITH, I.G., PERRY, R.H. y PERRY, E.K. (2000). Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication. *Neuroscience*, **98**, 79-87.
- COUTURIER, S., BERTRAND, D., MATTER, J.M., HERNANDEZ, M.C., BERTRAND, S., MILLAR, N., VALERA, S., BARKAS, T. y BALLIVET, M. (1990a). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homooligomeric channel blocked by α -BTX. *Neuron*, **5**, 847-56.
- COUTURIER, S., ERKMAN, L., VALERA, S., RUNGGER, D., BERTRAND, S., BOULTER, J., BALLIVET, M. y BERTRAND, D. (1990b). $\alpha 5$, $\alpha 3$, and non- $\alpha 3$. Three clustered avian genes encoding neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related subunits. *J Biol Chem*, **265**, 17560-7.
- COVERNTON, P.J. y CONNOLLY, J.G. (1997). Differential modulation of rat neuronal nicotinic receptor subtypes by acute application of ethanol. *Br J Pharmacol*, **122**, 1661-8.

- CRIADO, M., ALAMO, L. y NAVARRO, A. (1992). Primary structure of an agonist binding subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Res*, **17**, 281-7.
- CRIADO, M., DOMINGUEZ DEL TORO, E., CARRASCO-SERRANO, C., SMILLIE, F.I., JUIZ, J.M., VINIEGRA, S. y BALLESTA, J.J. (1997). Differential expression of alpha-bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic receptors in adrenergic chromaffin cells: a role for transcription factor Egr-1. *J Neurosci*, **17**, 6554-64.
- CRIADO, M., VALOR, L.M., MULET, J., GERBER, S., SALA, S. y SALA, F. Expression and functional properties of alpha7 acetylcholine nicotinic receptors are modified in the presence of other receptor subunits. *J Neurochem*.
- CUEVAS, J. y BERG, D.K. (1998). Mammalian nicotinic receptors with alpha7 subunits that slowly desensitize and rapidly recover from alpha-bungarotoxin blockade. *J Neurosci*, **18**, 10335-44.
- CURTIS, L., BUISSON, B., BERTRAND, S. y BERTRAND, D. (2002). Potentiation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol Pharmacol*, **61**, 127-35.
- CZAJKOWSKI, C. y KARLIN, A. (1995). Structure of the nicotinic receptor acetylcholine-binding site. Identification of acidic residues in the delta subunit within 0.9 nm of the 5 alpha subunit-binding. *J Biol Chem*, **270**, 3160-4.
- CZAJKOWSKI, C., KAUFMANN, C. y KARLIN, A. (1993). Negatively charged amino acid residues in the nicotinic receptor delta subunit that contribute to the binding of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6285-9.
- CHAKRAPANI, S., BAILEY, T.D. y AUERBACH, A. (2004). Gating dynamics of the acetylcholine receptor extracellular domain. *J Gen Physiol*, **123**, 341-56.
- CHAMPTIAUX, N. y CHANGEUX, J.P. (2004). Knockout and knockin mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Prog Brain Res*, **145**, 235-51.
- CHAMPTIAUX, N., GOTTI, C., CORDERO-ERAUSQUIN, M., DAVID, D.J., PRZYBYLSKI, C., LENA, C., CLEMENTI, F., MORETTI, M., ROSSI, F.M., LE NOVERE, N., MCINTOSH, J.M., GARDIER, A.M. y CHANGEUX, J.P. (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci*, **23**, 7820-9.
- CHANG, Y. y WEISS, D.S. (1999). Allosteric activation mechanism of the alpha 1 beta 2 gamma 2 gamma-aminobutyric acid type A receptor revealed by mutation of the conserved M2 leucine. *Biophys J*, **77**, 2542-51.
- CHAVEZ-NORIEGA, L.E., CRONA, J.H., WASHBURN, M.S., URRUTIA, A., ELLIOTT, K.J. y JOHNSON, E.C. (1997). Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **280**, 346-56.
- CHE, D., WEGGE, T., STUBBS, M.T., SEITZ, G., MEIER, H. y METHFESSEL, C. (2001). exo-2-(Pyridazin-4-yl)-7-azabicyclo[2.2.1]heptanes: syntheses and nicotinic acetylcholine receptor agonist activity of potent pyridazine analogues of (+/-)-epibatidine. *J Med Chem*, **44**, 47-57.
- CHIAPPINELLI, V.A. (1985). Actions of snake venom toxins on neuronal nicotinic receptors and other neuronal receptors. *Pharmacol Ther*, **31**, 1-32.
- CHIMIENTI, F., HOGG, R.C., PLANTARD, L., LEHMANN, C., BRAKCH, N., FISCHER, J., HUBER, M., BERTRAND, D. y HOHL, D. (2003). Identification of SLURP-1 as an epidermal

- neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum Mol Genet*, **12**, 3017-24.
- CHINI, B., CLEMENTI, F., HUKOVIC, N. y SHER, E. (1992). Neuronal-type alpha-bungarotoxin receptors and the alpha 5-nicotinic receptor subunit gene are expressed in neuronal and nonneuronal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 1572-6.
- CHO, A.K., HASLETT, W.L. y JENDEN, D.J. (1962). The peripheral actions of oxotremorine, a metabolite of tremorine. *J Pharmacol Exp Ther*, **138**, 249-57.
- DAJAS-BAILADOR, F. y WONNACOTT, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 317-24.
- DALE, H.H., FELDBERG, W. y VOGT, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol*, **86**, 353-80.
- DANI, J.A. (2001). Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, **49**, 166-74.
- DAUBAS, P., DEVILLERS-THIERY, A., GEOFFROY, B., MARTINEZ, S., BESSIS, A. y CHANGEUX, J.P. (1990). Differential expression of the neuronal acetylcholine receptor alpha 2 subunit gene during chick brain development. *Neuron*, **5**, 49-60.
- DECKER, M.W., ANDERSON, D.J., BRIONI, J.D., DONNELLY-ROBERTS, D.L., KANG, C.H., O'NEILL, A.B., PIATTONI-KAPLAN, M., SWANSON, S. y SULLIVAN, J.P. (1995). Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, **280**, 79-89.
- DEL CASTILLO, J. y KATZ, B. (1957). A comparison of acetylcholine and stable depolarizing agents. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **146**, 362-8.
- DEMURO, A., PALMA, E., EUSEBI, F. y MILEDI, R. (2001). Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by bicuculline. *Neuropharmacology*, **41**, 854-61.
- DENERIS, E.S., BOULTER, J., SWANSON, L.W., PATRICK, J. y HEINEMANN, S. (1989). Beta 3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. *J Biol Chem*, **264**, 6268-72.
- DENNIS, M., GIRAUDAT, J., KOTZYBA-HIBERT, F., GOELDNER, M., HIRTH, C., CHANG, J.Y., LAZURE, C., CHRETIEN, M. y CHANGEUX, J.P. (1988). Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry*, **27**, 2346-57.
- DI ANGELANTONIO, S., GINIATULLIN, R., COSTA, V., SOKOLOVA, E. y NISTRI, A. (2003). Modulation of neuronal nicotinic receptor function by the neuropeptides CGRP and substance P on autonomic nerve cells. *Br J Pharmacol*, **139**, 1061-73.
- DONNELLY-ROBERTS, D.L., ARNERIC, S.P. y SULLIVAN, J.P. (1995). Functional modulation of human "ganglionic-like" neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) by L-type calcium channel antagonists. *Biochem Biophys Res Commun*, **213**, 657-62.
- DOUGLAS, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol*, **34**, 451-74.
- DOUGLAS, W.W., KANNO, T. y SAMPSON, S.R. (1967). Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J Physiol*, **188**, 107-20.

- DRAGO, J., MCCOLL, C.D., HORNE, M.K., FINKELSTEIN, D.I. y ROSS, S.A. (2003). Neuronal nicotinic receptors: insights gained from gene knockout and knockin mutant mice. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1267-80.
- DRISDEL, R.C. y GREEN, W.N. (2000). Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J Neurosci*, **20**, 133-9.
- DUTTARROY, A., GOMEZA, J., GAN, J.W., SIDDIQUI, N., BASILE, A.S., HARMAN, W.D., SMITH, P.L., FELDER, C.C., LEVEY, A.I. y WESS, J. (2002). Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol*, **62**, 1084-93.
- EATON, J.B., PENG, J.H., SCHROEDER, K.M., GEORGE, A.A., FRYER, J.D., KRISHNAN, C., BUHLMAN, L., KUO, Y.P., STEINLEIN, O. y LUKAS, R.J. (2003). Characterization of human alpha 4 beta 2-nicotinic acetylcholine receptors stably and heterologously expressed in native nicotinic receptor-null SH-EP1 human epithelial cells. *Mol Pharmacol*, **64**, 1283-94.
- EDMONDS, B., GIBB, A.J. y COLQUHOUN, D. (1995). Mechanisms of activation of muscle nicotinic acetylcholine receptors and the time course of endplate currents. *Annu Rev Physiol*, **57**, 469-93.
- EL-HAJJ, R.A., MCKAY, S.B. y MCKAY, D.B. (2007). Pharmacological and immunological identification of native alpha7 nicotinic receptors: evidence for homomeric and heteromeric alpha7 receptors. *Life Sci*, **81**, 1317-22.
- ELGOYHEN, A.B., JOHNSON, D.S., BOULTER, J., VETTER, D.E. y HEINEMANN, S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell*, **79**, 705-15.
- ELGOYHEN, A.B., VETTER, D.E., KATZ, E., ROTHLIN, C.V., HEINEMANN, S.F. y BOULTER, J. (2001). alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3501-6.
- ESHEL, Y. y KORCZYN, A.D. (1979). Amantadine antagonism of oxotremorine effects. *J Neural Transm*, **46**, 79-83.
- EVERETT, G.M., BLOCKUS, L.E. y SHEPPERD, I.M. (1956). Tremor induced by tremorine and its antagonism by anti-Parkinson drugs. *Science*, **124**, 79.
- FENWICK, E.M., MARTY, A. y NEHER, E. (1982). A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J Physiol*, **331**, 577-97.
- FERNANDEZ, J.M., GRANJA, R., IZAGUIRRE, V., GONZALEZ-GARCIA, C. y CENA, V. (1995). omega-Conotoxin GVIA blocks nicotine-induced catecholamine secretion by blocking the nicotinic receptor-activated inward currents in bovine chromaffin cells. *Neurosci Lett*, **191**, 59-62.
- FILATOV, G.N. y WHITE, M.M. (1995). The role of conserved leucines in the M2 domain of the acetylcholine receptor in channel gating. *Mol Pharmacol*, **48**, 379-84.
- FISCHER, H., ORR-URTREGER, A., ROLE, L.W. y HUCK, S. (2005). Selective deletion of the alpha5 subunit differentially affects somatic-dendritic versus axonally targeted nicotinic ACh receptors in mouse. *J Physiol*, **563**, 119-37.
- FLORA, A., SCHULZ, R., BENFANTE, R., BATTAGLIOLI, E., TERZANO, S., CLEMENTI, F. y FORNASARI, D. (2000a). Neuronal and extraneuronal expression and regulation of the human alpha5 nicotinic receptor subunit gene. *J Neurochem*, **75**, 18-27.
- FLORA, A., SCHULZ, R., BENFANTE, R., BATTAGLIOLI, E., TERZANO, S., CLEMENTI, F. y FORNASARI, D. (2000b). Transcriptional regulation of the human alpha5

- nicotinic receptor subunit gene in neuronal and non-neuronal tissues. *Eur J Pharmacol*, **393**, 85-95.
- FLORES, C.M., ROGERS, S.W., PABREZA, L.A., WOLFE, B.B. y KELLAR, K.J. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol*, **41**, 31-7.
- FORSAYETH, J.R. y KOBRIN, E. (1997). Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor. *J Neurosci*, **17**, 1531-8.
- FOWLER, C.D., ARENDS, M.A. y KENNY, P.J. (2008). Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol*, **19**, 461-84.
- FRANCIS, M.M., CHENG, E.Y., WEILAND, G.A. y OSWALD, R.E. (2001). Specific activation of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor by a quaternary analog of cocaine. *Mol Pharmacol*, **60**, 71-9.
- FRANCIS, M.M., VAZQUEZ, R.W., PAPKE, R.L. y OSWALD, R.E. (2000). Subtype-selective inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cocaine is determined by the alpha4 and beta4 subunits. *Mol Pharmacol*, **58**, 109-19.
- FRAZIER, C.J., BUHLER, A.V., WEINER, J.L. y DUNWIDDIE, T.V. (1998a). Synaptic potentials mediated via alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal interneurons. *J Neurosci*, **18**, 8228-35.
- FRAZIER, C.J., ROLLINS, Y.D., BREESE, C.R., LEONARD, S., FREEDMAN, R. y DUNWIDDIE, T.V. (1998b). Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci*, **18**, 1187-95.
- FRAZIER, C.J., ROLLINS, Y.D., HALL, M.E., YOUNG, D.A. y ROSE, G.M. (1996). Cholinergic deafferentation enhances rat hippocampal pyramidal neuron responsiveness to locally applied nicotine. *Brain Res*, **727**, 217-20.
- FREEDMAN, S.B., BEER, M.S. y HARLEY, E.A. (1988). Muscarinic M1, M2 receptor binding. Relationship with functional efficacy. *Eur J Pharmacol*, **156**, 133-42.
- FRYER, J.D. y LUKAS, R.J. (1999). Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurochem*, **72**, 1117-24.
- FUCILE, S., MATTER, J.M., ERKMAN, L., RAGOZZINO, D., BARABINO, B., GRASSI, F., ALEMA, S., BALLIVET, M. y EUSEBI, F. (1998). The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur J Neurosci*, **10**, 172-8.
- FUCILE, S., PALMA, E., EUSEBI, F. y MILEDI, R. (2002). Serotonin antagonizes the human neuronal alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and becomes an agonist after L248T alpha7 mutation. *Neuroscience*, **110**, 169-79.
- FUENTEALBA, J., OLIVARES, R., ALES, E., TAPIA, L., ROJO, J., ARROYO, G., ALDEA, M., CRIADO, M., GANDIA, L. y GARCIA, A.G. (2004). A choline-evoked $[Ca^{2+}]_c$ signal causes catecholamine release and hyperpolarization of chromaffin cells. *Faseb J*, **18**, 1468-70.
- GALZI, J.L., REVAH, F., BESSIS, A. y CHANGEUX, J.P. (1991). Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **31**, 37-72.

- GALZI, J.L., REVAH, F., BLACK, D., GOELDNER, M., HIRTH, C. y CHANGEUX, J.P. (1990). Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *J Biol Chem*, **265**, 10430-7.
- GANDIA, L., VILLARROYA, M., SALA, F., REIG, J.A., VINIEGRA, S., QUINTANAR, J.L., GARCIA, A.G. y GUTIERREZ, L.M. (1996). Inhibition of nicotinic receptor-mediated responses in bovine chromaffin cells by diltiazem. *Br J Pharmacol*, **118**, 1301-7.
- GAO, F., BREN, N., BURGHARDT, T.P., HANSEN, S., HENCHMAN, R.H., TAYLOR, P., MCCAMMON, J.A. y SINE, S.M. (2005). Agonist-mediated conformational changes in acetylcholine-binding protein revealed by simulation and intrinsic tryptophan fluorescence. *J Biol Chem*, **280**, 8443-51.
- GARCIA-COLUNGA, J., AWAD, J.N. y MILEDI, R. (1997). Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2041-4.
- GARCIA-GUZMAN, M., SALA, F., SALA, S., CAMPOS-CARO, A., STUHMER, W., GUTIERREZ, L.M. y CRIADO, M. (1995). alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors on bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the alpha 7 subunit. *Eur J Neurosci*, **7**, 647-55.
- GEORGE, A.A., LUCERO, L.M., DAMAJ, M.I., LUKAS, R.J., CHEN, X. y WHITEAKER, P. Function of human alpha3beta4alpha5 nicotinic acetylcholine receptors is reduced by the alpha5(D398N) variant. *J Biol Chem*, **287**, 25151-62.
- GERZANICH, V., KURYATOV, A., ANAND, R. y LINDSTROM, J. (1997). "Orphan" alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*, **51**, 320-7.
- GERZANICH, V., WANG, F., KURYATOV, A. y LINDSTROM, J. (1998). alpha 5 Subunit alters desensitization, pharmacology, Ca⁺⁺ permeability and Ca⁺⁺ modulation of human neuronal alpha 3 nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **286**, 311-20.
- GINIATULLIN, R., DI ANGELANTONIO, S., MARCHETTI, C., SOKOLOVA, E., KHIROUG, L. y NISTRI, A. (1999). Calcitonin gene-related peptide rapidly downregulates nicotinic receptor function and slowly raises intracellular Ca²⁺ in rat chromaffin cells in vitro. *J Neurosci*, **19**, 2945-53.
- GINIATULLIN, R., NISTRI, A. y YAKEL, J.L. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci*, **28**, 371-8.
- GOLDNER, F.M., DINELEY, K.T. y PATRICK, J.W. (1997). Immunohistochemical localization of the nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha6 to dopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area. *Neuroreport*, **8**, 2739-42.
- GOTTI, C. y CLEMENTI, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*, **74**, 363-96.
- GOTTI, C., MORETTI, M., BOHR, I., ZIABREVA, I., VAILATI, S., LONGHI, R., RIGANTI, L., GAIMARRI, A., MCKEITH, I.G., PERRY, R.H., AARSLAND, D., LARSEN, J.P., SHER, E., BEATTIE, R., CLEMENTI, F. y COURT, J.A. (2006a). Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol Dis*, **23**, 481-9.

- GOTTI, C., MORETTI, M., LONGHI, R., BRISCINI, L., BALESTRA, B. y CLEMENTI, F. (1994). Expression of alpha-bungarotoxin receptor subtypes in chick central nervous system during development. *J Recept Res*, **14**, 335-46.
- GOTTI, C., MORETTI, M., MAGGI, R., LONGHI, R., HANKE, W., KLINKE, N. y CLEMENTI, F. (1997). Alpha7 and alpha8 nicotinic receptor subtypes immunopurified from chick retina have different immunological, pharmacological and functional properties. *Eur J Neurosci*, **9**, 1201-11.
- GOTTI, C., RIGANTI, L., VAILATI, S. y CLEMENTI, F. (2006b). Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. *Curr Pharm Des*, **12**, 407-28.
- GRADY, S.R., MORETTI, M., ZOLI, M., MARKS, M.J., ZANARDI, A., PUCCI, L., CLEMENTI, F. y GOTTI, C. (2009). Rodent habenulo-interpeduncular pathway expresses a large variety of uncommon nAChR subtypes, but only the $\alpha 3\beta 4^*$ and $\alpha 3\beta 3\beta 4^*$ subtypes mediate acetylcholine release. *J Neurosci*, **29**, 2272-82.
- GRANDO, S.A. (2008). Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Sci*, **106**, 174-9.
- GRANDO, S.A., HORTON, R.M., MAURO, T.M., KIST, D.A., LEE, T.X. y DAHL, M.V. (1996). Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol*, **107**, 412-8.
- GRANJA, R., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.M., IZAGUIRRE, V., GONZALEZ-GARCIA, C. y CENA, V. (1995). omega-Agatoxin IVA blocks nicotinic receptor channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett*, **362**, 15-8.
- GRANON, S., FAURE, P. y CHANGEUX, J.P. (2003). Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9596-601.
- GREEN, W.N. y CLAUDIO, T. (1993). Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell*, **74**, 57-69.
- GREENFIELD, S.A., DAY, T., MANN, E.O. y BERMUDEZ, I. (2004). A novel peptide modulates $\alpha 7$ nicotinic receptor responses: implications for a possible trophic-toxic mechanism within the brain. *J Neurochem*, **90**, 325-31.
- GRISHIN, A.A., WANG, C.I., MUTTENTHALER, M., ALEWOOD, P.F., LEWIS, R.J. y ADAMS, D.J. Alpha-conotoxin AulB isomers exhibit distinct inhibitory mechanisms and differential sensitivity to stoichiometry of $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, **285**, 22254-63.
- GRONLIEN, J.H., HAKERUD, M., WEEN, H., THORIN-HAGENE, K., BRIGGS, C.A., GOPALAKRISHNAN, M. y MALYSZ, J. (2007). Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes. *Mol Pharmacol*, **72**, 715-24.
- GROOT-KORMELINK, P.J., BOORMAN, J.P. y SIVILOTTI, L.G. (2001). Formation of functional $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ human neuronal nicotinic receptors in *Xenopus* oocytes: a reporter mutation approach. *Br J Pharmacol*, **134**, 789-96.
- GROOT-KORMELINK, P.J., BROADBENT, S., BEATO, M. y SIVILOTTI, L.G. (2006). Constraining the expression of nicotinic acetylcholine receptors by using pentameric constructs. *Mol Pharmacol*, **69**, 558-63.
- GROOT-KORMELINK, P.J., BROADBENT, S.D., BOORMAN, J.P. y SIVILOTTI, L.G. (2004). Incomplete incorporation of tandem subunits in recombinant neuronal nicotinic receptors. *J Gen Physiol*, **123**, 697-708.

- GROOT-KORMELINK, P.J., LUYTEN, W.H., COLQUHOUN, D. y SIVILOTTI, L.G. (1998). A reporter mutation approach shows incorporation of the "orphan" subunit beta3 into a functional nicotinic receptor. *J Biol Chem*, **273**, 15317-20.
- GROTTICK, A.J. y HIGGINS, G.A. (2000). Effect of subtype selective nicotinic compounds on attention as assessed by the five-choice serial reaction time task. *Behav Brain Res*, **117**, 197-208.
- HAGGBLAD, J., ERIKSSON, H. y HEILBRONN, E. (1985). Oxotremorine acts as a partial nicotinic agonist on cultured chick myotubes. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, **57**, 317-21.
- HALES, T.G., DUNLOP, J.I., DEEB, T.Z., CARLAND, J.E., KELLEY, S.P., LAMBERT, J.J. y PETERS, J.A. (2006). Common determinants of single channel conductance within the large cytoplasmic loop of 5-hydroxytryptamine type 3 and alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, **281**, 8062-71.
- HAN, Z.Y., LE NOVERE, N., ZOLI, M., HILL, J.A., JR., CHAMPTIAUX, N. y CHANGEUX, J.P. (2000). Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci*, **12**, 3664-74.
- HAN, Z.Y., ZOLI, M., CARDONA, A., BOURGEOIS, J.P., CHANGEUX, J.P. y LE NOVERE, N. (2003). Localization of [3H]nicotine, [3H]cytisine, [3H]epibatidine, and [125I]alpha-bungarotoxin binding sites in the brain of *Macaca mulatta*. *J Comp Neurol*, **461**, 49-60.
- HANSEN, S.B., SULZENBACHER, G., HUXFORD, T., MARCHOT, P., TAYLOR, P. y BOURNE, Y. (2005). Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *Embo J*, **24**, 3635-46.
- HANSEN, S.B. y TAYLOR, P. (2007). Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to ACh-binding protein: evidence for a binding site on non-alpha-subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors. *J Mol Biol*, **369**, 895-901.
- HARVEY, S.C., MCINTOSH, J.M., CARTIER, G.E., MADDOX, F.N. y LUETJE, C.W. (1997). Determinants of specificity for alpha-conotoxin MII on alpha3beta2 neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, **51**, 336-42.
- HEGE, T. y BAUMANN, U. (2001). The conserved methionine residue of the metzincins: a site-directed mutagenesis study. *J Mol Biol*, **314**, 181-6.
- HENNINGS, E.C., KISS, J.P., DE OLIVEIRA, K., TOTH, P.T. y VIZI, E.S. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor antagonistic activity of monoamine uptake blockers in rat hippocampal slices. *J Neurochem*, **73**, 1043-50.
- HERNANDEZ, S.C., VICINI, S., XIAO, Y., DAVILA-GARCIA, M.I., YASUDA, R.P., WOLFE, B.B. y KELLAR, K.J. (2004). The nicotinic receptor in the rat pineal gland is an alpha3beta4 subtype. *Mol Pharmacol*, **66**, 978-87.
- HERRERO, C.J., ALES, E., PINTADO, A.J., LOPEZ, M.G., GARCIA-PALOMERO, E., MAHATA, S.K., O'CONNOR, D.T., GARCIA, A.G. y MONTIEL, C. (2002). Modulatory mechanism of the endogenous peptide catestatin on neuronal nicotinic acetylcholine receptors and exocytosis. *J Neurosci*, **22**, 377-88.
- HONG, S.J. y CHANG, C.C. (1990). Nicotinic actions of oxotremorine on murine skeletal muscle. Evidence against muscarinic modulation of acetylcholine release. *Brain Res*, **534**, 142-8.
- HORENSTEIN, N.A., MCCORMACK, T.J., STOKES, C., REN, K. y PAPKE, R.L. (2007). Reversal of agonist selectivity by mutations of conserved amino acids in the binding site of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*, **282**, 5899-909.

- HSIAO, B., DWECK, D. y LUETJE, C.W. (2001). Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J Neurosci*, **21**, 1848-56.
- HUANG, L.Y., CATTERALL, W.A. y EHRENSTEIN, G. (1978). Selectivity of cations and nonelectrolytes for acetylcholine-activated channels in cultured muscle cells. *J Gen Physiol*, **71**, 397-410.
- HUGANIR, R.L., DELCOUR, A.H., GREENGARD, P. y HESS, G.P. (1986). Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature*, **321**, 774-6.
- HURST, R.S., HAJOS, M., RAGGENBASS, M., WALL, T.M., HIGDON, N.R., LAWSON, J.A., RUTHERFORD-ROOT, K.L., BERKENPAS, M.B., HOFFMANN, W.E., PIOTROWSKI, D.W., GROPP, V.E., ALLAMAN, G., OGIER, R., BERTRAND, S., BERTRAND, D. y ARNERIC, S.P. (2005). A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci*, **25**, 4396-405.
- IBANEZ-TALLON, I., MIWA, J.M., WANG, H.L., ADAMS, N.C., CRABTREE, G.W., SINE, S.M. y HEINTZ, N. (2002). Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1. *Neuron*, **33**, 893-903.
- IMOTO, K. (1993). Ion channels: molecular basis of ion selectivity. *FEBS Lett*, **325**, 100-3.
- IMOTO, K., BUSCH, C., SAKMANN, B., MISHINA, M., KONNO, T., NAKAI, J., BUJO, H., MORI, Y., FUKUDA, K. y NUMA, S. (1988). Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature*, **335**, 645-8.
- IMOTO, K., KONNO, T., NAKAI, J., WANG, F., MISHINA, M. y NUMA, S. (1991). A ring of uncharged polar amino acids as a component of channel constriction in the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett*, **289**, 193-200.
- ITOH, H., ANDOH, T., WATANABE, I., SASAKI, T., KAMIYA, Y. y OKUMURA, F. (2000). Dynorphins directly inhibit neuronal nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells. *Eur J Neurosci*, **12**, 1253-62.
- IZAGUIRRE, V., FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.M., CENA, V. y GONZALEZ-GARCIA, C. (1997). Tricyclic antidepressants block cholinergic nicotinic receptors and ATP secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett*, **418**, 39-42.
- JACKSON, M.B. (1988). Dependence of acetylcholine receptor channel kinetics on agonist concentration in cultured mouse muscle fibres. *J Physiol*, **397**, 555-83.
- JACKSON, M.B. (1989). Perfection of a synaptic receptor: kinetics and energetics of the acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2199-203.
- JACOBSEN, R.B., DELACRUZ, R.G., GROSE, J.H., MCINTOSH, J.M., YOSHIKAMI, D. y OLIVERA, B.M. (1999). Critical residues influence the affinity and selectivity of α -conotoxin M1 for nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemistry*, **38**, 13310-5.
- JENSEN, M.L., SCHOUSBOE, A. y AHRING, P.K. (2005). Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *J Neurochem*, **92**, 217-25.
- JI, D., LAPE, R. y DANI, J.A. (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **31**, 131-41.

- JOHNSON, A.T., KLEIN, E.S., GILLET, S.J., WANG, L., SONG, T.K., PINO, M.E. y CHANDRARATNA, R.A. (1995a). Synthesis and characterization of a highly potent and effective antagonist of retinoic acid receptors. *J Med Chem*, **38**, 4764-7.
- JOHNSON, D.S., MARTINEZ, J., ELGOYHEN, A.B., HEINEMANN, S.F. y MCINTOSH, J.M. (1995b). alpha-Conotoxin Iml exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric alpha 7 and alpha 9 receptors. *Mol Pharmacol*, **48**, 194-9.
- JONES, A.K. y SATTELLE, D.B. (2006). The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the honeybee, *Apis mellifera*. *Invert Neurosci*, **6**, 123-32.
- JONES, S., SUDWEEKS, S. y YAKEL, J.L. (1999). Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci*, **22**, 555-61.
- KAGEYAMA, H. y GUIDOTTI, A. (1984). Effect of alpha-bungarotoxin and etorphine on acetylcholine-evoked release of endogenous and radiolabeled catecholamines from primary culture of adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Methods*, **10**, 9-16.
- KANEKO, S., MAEDA, T., KUME, T., KOCHIYAMA, H., AKAIKE, A., SHIMOHAMA, S. y KIMURA, J. (1997). Nicotine protects cultured cortical neurons against glutamate-induced cytotoxicity via alpha7-neuronal receptors and neuronal CNS receptors. *Brain Res*, **765**, 135-40.
- KAO, P.N. y KARLIN, A. (1986). Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem*, **261**, 8085-8.
- KARLIN, A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 102-14.
- KARLIN, A. y AKABAS, M.H. (1995). Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron*, **15**, 1231-44.
- KASH, T.L., JENKINS, A., KELLEY, J.C., TRUDELL, J.R. y HARRISON, N.L. (2003). Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature*, **421**, 272-5.
- KATZ, B. y THESLEFF, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol*, **138**, 63-80.
- KATZ, E., ELGOYHEN, A.B., GOMEZ-CASATI, M.E., KNIPPER, M., VETTER, D.E., FUCHS, P.A. y GLOWATZKI, E. (2004). Developmental regulation of nicotinic synapses on cochlear inner hair cells. *J Neurosci*, **24**, 7814-20.
- KE, L. y LUKAS, R.J. (1996). Effects of steroid exposure on ligand binding and functional activities of diverse nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *J Neurochem*, **67**, 1100-12.
- KEYSER, K.T., BRITTO, L.R., SCHOEPPER, R., WHITING, P., COOPER, J., CONROY, W., BROZOWSKA-PRECHTL, A., KARTEN, H.J. y LINDSTROM, J. (1993). Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J Neurosci*, **13**, 442-54.
- KHIROUG, S.S., HARKNESS, P.C., LAMB, P.W., SUDWEEKS, S.N., KHIROUG, L., MILLAR, N.S. y YAKEL, J.L. (2002). Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol*, **540**, 425-34.
- KIDOKORO, Y., MIYAZAKI, S. y OZAWA, S. (1982). Acetylcholine-induced membrane depolarization and potential fluctuations in the rat adrenal chromaffin cell. *J Physiol*, **324**, 203-20.

- KILPATRICK, D.L., SLEPETIS, R. y KIRSHNER, N. (1981). Inhibition of catecholamine secretion from adrenal medulla cells by neurotoxins and cholinergic antagonists. *J Neurochem*, **37**, 125-31.
- KISS, J.P., WINDISCH, K., BALLA, A., SERSHEN, H. y LAJTHA, A. (1997). Dual effect of DMPP on the resting release of noradrenaline from rat hippocampal slices. *Brain Res Bull*, **43**, 257-62.
- KONNO, T., BUSCH, C., VON KITZING, E., IMOTO, K., WANG, F., NAKAI, J., MISHINA, M., NUMA, S. y SAKMANN, B. (1991). Rings of anionic amino acids as structural determinants of ion selectivity in the acetylcholine receptor channel. *Proc Biol Sci*, **244**, 69-79.
- KOSOLAPOV, A.V., FILATOV, G.N. y WHITE, M.M. (2000). Acetylcholine receptor gating is influenced by the polarity of amino acids at position 9' in the M2 domain. *J Membr Biol*, **174**, 191-7.
- KRASHIA, P., MORONI, M., BROADBENT, S., HOFMANN, G., KRACUN, S., BEATO, M., GROOT-KORMELINK, P.J. y SIVILOTTI, L.G. (2010). Human $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors show different stoichiometry if they are expressed in *Xenopus* oocytes or mammalian HEK293 cells. *PLoS One*, **5**, e13611.
- KRAUSE, R.M., BUISSON, B., BERTRAND, S., CORRINGER, P.J., GALZI, J.L., CHANGEUX, J.P. y BERTRAND, D. (1998). Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol*, **53**, 283-94.
- KUMAKURA, K., KAROUM, F., GUIDOTTI, A. y COSTA, E. (1980). Modulation of nicotinic receptors by opiate receptor agonists in cultured adrenal chromaffin cells. *Nature*, **283**, 489-92.
- KUSANO, K., MILEDI, R. y STINNAKRE, J. (1982). Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *J Physiol*, **328**, 143-70.
- LAPE, R., COLQUHOUN, D. y SIVILOTTI, L.G. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature*, **454**, 722-7.
- LAUBE, B., KUHSE, J. y BETZ, H. (2000). Kinetic and mutational analysis of Zn^{2+} modulation of recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol*, **522 Pt 2**, 215-30.
- LE NOVERE, N., CORRINGER, P.J. y CHANGEUX, J.P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol*, **53**, 447-56.
- LE NOVERE, N., ZOLI, M. y CHANGEUX, J.P. (1996). Neuronal nicotinic receptor $\alpha 6$ subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur J Neurosci*, **8**, 2428-39.
- LEE, M., MARTIN-RUIZ, C., GRAHAM, A., COURT, J., JAROS, E., PERRY, R., IVERSEN, P., BAUMAN, M. y PERRY, E. (2002). Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain*, **125**, 1483-95.
- LEE, W.Y. y SINE, S.M. (2005). Principal pathway coupling agonist binding to channel gating in nicotinic receptors. *Nature*, **438**, 243-7.
- LEONARD, R.J., LABARCA, C.G., CHARNET, P., DAVIDSON, N. y LESTER, H.A. (1988). Evidence that the M2 membrane-spanning region lines the ion channel pore of the nicotinic receptor. *Science*, **242**, 1578-81.
- LESTER, H.A., DIBAS, M.I., DAHAN, D.S., LEITE, J.F. y DOUGHERTY, D.A. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci*, **27**, 329-36.

- LEVANDOSKI, M.M., PIKET, B. y CHANG, J. (2003). The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol*, **471**, 9-20.
- LEVY, R.B. y AOKI, C. (2002). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors occur at postsynaptic densities of AMPA receptor-positive and -negative excitatory synapses in rat sensory cortex. *J Neurosci*, **22**, 5001-15.
- LEWIS, T.M., HARKNESS, P.C., SIVILOTTI, L.G., COLQUHOUN, D. y MILLAR, N.S. (1997). The ion channel properties of a rat recombinant neuronal nicotinic receptor are dependent on the host cell type. *J Physiol*, **505** (Pt 2), 299-306.
- LIN, Y. y PHILLIS, J.W. (1991). Muscarinic agonist oxotremorine-M-induced long-term depression in rat cerebral cortex. *Brain Res Bull*, **27**, 115-7.
- LIODYNO, M.I., VERBITSKY, M., GLOWATZKI, E., HOLT, J.C., BOULTER, J., ZADINA, J.E., ELGOYHEN, A.B. y GUTH, P.S. (2002). The alpha9/alpha10-containing nicotinic ACh receptor is directly modulated by opioid peptides, endomorphin-1, and dynorphin B, proposed efferent cotransmitters in the inner ear. *Mol Cell Neurosci*, **20**, 695-711.
- LIPS, K.S., PFEIL, U. y KUMMER, W. (2002). Coexpression of alpha 9 and alpha 10 nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, **115**, 1-5.
- LIU, Q., HUANG, Y., XUE, F., SIMARD, A., DECHON, J., LI, G., ZHANG, J., LUCERO, L., WANG, M., SIERKS, M., HU, G., CHANG, Y., LUKAS, R.J. y WU, J. (2009). A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *J Neurosci*, **29**, 918-29.
- LIU, Q., KAWAI, H. y BERG, D.K. (2001). beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4734-9.
- LIVETT, B.G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev*, **64**, 1103-61.
- LIVETT, B.G., KOZOUSEK, V., MIZOBE, F. y DEAN, D.M. (1979). Substance P inhibits nicotinic activation of chromaffin cells. *Nature*, **278**, 256-7.
- LOPEZ-HERNANDEZ, G.Y., SANCHEZ-PADILLA, J., ORTIZ-ACEVEDO, A., LIZARDI-ORTIZ, J., SALAS-VINCENTY, J., ROJAS, L.V. y LASALDE-DOMINICCI, J.A. (2004). Nicotine-induced up-regulation and desensitization of alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors depend on subunit ratio. *J Biol Chem*, **279**, 38007-15.
- LOPEZ, M.G., FONTERIZ, R.I., GANDIA, L., DE LA FUENTE, M., VILLARROYA, M., GARCIA-SANCHO, J. y GARCIA, A.G. (1993). The nicotinic acetylcholine receptor of the bovine chromaffin cell, a new target for dihydropyridines. *Eur J Pharmacol*, **247**, 199-207.
- LOPEZ, M.G., MONTIEL, C., HERRERO, C.J., GARCIA-PALOMERO, E., MAYORGAS, I., HERNANDEZ-GUIJO, J.M., VILLARROYA, M., OLIVARES, R., GANDIA, L., MCINTOSH, J.M., OLIVERA, B.M. y GARCIA, A.G. (1998). Unmasking the functions of the chromaffin cell alpha7 nicotinic receptor by using short pulses of acetylcholine and selective blockers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14184-9.
- LUETJE, C.W. y PATRICK, J. (1991). Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*, **11**, 837-45.
- LUETJE, C.W., WADA, K., ROGERS, S., ABRAMSON, S.N., TSUJI, K., HEINEMANN, S. y PATRICK, J. (1990). Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. *J Neurochem*, **55**, 632-40.

- LYFORD, L.K., SPROUL, A.D., EDDINS, D., MCLAUGHLIN, J.T. y ROSENBERG, R.L. (2003). Agonist-induced conformational changes in the extracellular domain of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, **64**, 650-8.
- MAELICKE, A., COBAN, T., STORCH, A., SCHRATTENHOLZ, A., PEREIRA, E.F. y ALBUQUERQUE, E.X. (1997). Allosteric modulation of Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel activity by noncompetitive agonists. *J Recept Signal Transduct Res*, **17**, 11-28.
- MAGGI, L., PALMA, E., MILEDI, R. y EUSEBI, F. (1998). Effects of fluoxetine on wild and mutant neuronal alpha 7 nicotinic receptors. *Mol Psychiatry*, **3**, 350-5.
- MAHATA, M., MAHATA, S.K., PARMER, R.J. y O'CONNOR, D.T. (1998). Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide: minimal active region to regulate nicotinic receptors. *Hypertension*, **32**, 907-16.
- MAHATA, S.K., O'CONNOR, D.T., MAHATA, M., YOO, S.H., TAUPENOT, L., WU, H., GILL, B.M. y PARMER, R.J. (1997). Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest*, **100**, 1623-33.
- MANDELZYS, A., PIE, B., DENERIS, E.S. y COOPER, E. (1994). The developmental increase in ACh current densities on rat sympathetic neurons correlates with changes in nicotinic ACh receptor alpha-subunit gene expression and occurs independent of innervation. *J Neurosci*, **14**, 2357-64.
- MANEU, V., ROJO, J., MULET, J., VALOR, L.M., SALA, F., CRIADO, M., GARCIA, A.G. y GANDIA, L. (2002). A single neuronal nicotinic receptor alpha3alpha7beta4* is present in the bovine chromaffin cell. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 165-7.
- MARRION, N.V., SMART, T.G., MARSH, S.J. y BROWN, D.A. (1989). Muscarinic suppression of the M-current in the rat sympathetic ganglion is mediated by receptors of the M1-subtype. *Br J Pharmacol*, **98**, 557-73.
- MARRITT, A.M., COX, B.C., YASUDA, R.P., MCINTOSH, J.M., XIAO, Y., WOLFE, B.B. y KELLAR, K.J. (2005). Nicotinic cholinergic receptors in the rat retina: simple and mixed heteromeric subtypes. *Mol Pharmacol*, **68**, 1656-68.
- MARTIN-RUIZ, C.M., HAROUTUNIAN, V.H., LONG, P., YOUNG, A.H., DAVIS, K.L., PERRY, E.K. y COURT, J.A. (2003). Dementia rating and nicotinic receptor expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, **54**, 1222-33.
- MARTIN-RUIZ, C.M., LEE, M., PERRY, R.H., BAUMANN, M., COURT, J.A. y PERRY, E.K. (2004). Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Brain Res Mol Brain Res*, **123**, 81-90.
- MARTINEZ, J.S., OLIVERA, B.M., GRAY, W.R., CRAIG, A.G., GROEBE, D.R., ABRAMSON, S.N. y MCINTOSH, J.M. (1995). alpha-Conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry*, **34**, 14519-26.
- MARUBIO, L.M., GARDIER, A.M., DURIER, S., DAVID, D., KLINK, R., ARROYO-JIMENEZ, M.M., MCINTOSH, J.M., ROSSI, F., CHAMPTIAUX, N., ZOLI, M. y CHANGEUX, J.P. (2003). Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the alpha4 subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci*, **17**, 1329-37.
- MATSUYAMA, S. y MATSUMOTO, A. (2003). Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in vivo in the intact mouse dentate gyrus: both alpha7 and alpha4beta2 nAChRs essential to nicotinic LTP. *J Pharmacol Sci*, **93**, 180-7.

- MCGEE, D.S. y ROLE, L.W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*, **57**, 521-46.
- MCINTOSH, J.M., SANTOS, A.D. y OLIVERA, B.M. (1999). Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Annu Rev Biochem*, **68**, 59-88.
- MCINTOSH, J.M., YOSHIKAMI, D., MAHE, E., NIELSEN, D.B., RIVIER, J.E., GRAY, W.R. y OLIVERA, B.M. (1994). A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, alpha-conotoxin Iml. *J Biol Chem*, **269**, 16733-9.
- MIDDLETON, R.E. y COHEN, J.B. (1991). Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label. *Biochemistry*, **30**, 6987-97.
- MIHOVILOVIC, M., HULETTE, C., MITTELSTAEDT, J., AUSTIN, C. y ROSES, A.D. (1993). Nicotinic neuronal acetylcholine receptor alpha-3 subunit transcription in normal and myasthenic thymus. *Ann N Y Acad Sci*, **681**, 83-96.
- MILLAR, N.S. y GOTTI, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, **56**, 237-46.
- MILLER, C. (1989). Genetic manipulation of ion channels: a new approach to structure and mechanism. *Neuron*, **2**, 1195-205.
- MILLER, P.S., BEATO, M., HARVEY, R.J. y SMART, T.G. (2005). Molecular determinants of glycine receptor alphabeta subunit sensitivities to Zn²⁺-mediated inhibition. *J Physiol*, **566**, 657-70.
- MINIER, F. y SIGEL, E. (2004). Positioning of the alpha-subunit isoforms confers a functional signature to gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7769-74.
- MIWA, J.M., IBANEZ-TALLON, I., CRABTREE, G.W., SANCHEZ, R., SALI, A., ROLE, L.W. y HEINTZ, N. (1999). lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*, **23**, 105-14.
- MIWA, J.M., STEVENS, T.R., KING, S.L., CALDARONE, B.J., IBANEZ-TALLON, I., XIAO, C., FITZSIMONDS, R.M., PAVLIDES, C., LESTER, H.A., PICCIOTTO, M.R. y HEINTZ, N. (2006). The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival in vivo. *Neuron*, **51**, 587-600.
- MIYAZAWA, A., FUJIYOSHI, Y., STOWELL, M. y UNWIN, N. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol*, **288**, 765-86.
- MIYAZAWA, A., FUJIYOSHI, Y. y UNWIN, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, **423**, 949-55.
- MORETTI, M., VAILATI, S., ZOLI, M., LIPPI, G., RIGANTI, L., LONGHI, R., VIEGI, A., CLEMENTI, F. y GOTTI, C. (2004). Nicotinic acetylcholine receptor subtypes expression during rat retina development and their regulation by visual experience. *Mol Pharmacol*, **66**, 85-96.
- MORO, M.A., LOPEZ, M.G., GANDIA, L., MICHELENA, P. y GARCIA, A.G. (1990). Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal Biochem*, **185**, 243-8.
- MORONI, M., VIJAYAN, R., CARBONE, A., ZWART, R., BIGGIN, P.C. y BERMUDEZ, I. (2008). Non-agonist-binding subunit interfaces confer distinct functional signatures to the alternate stoichiometries of the alpha4beta2 nicotinic receptor: an alpha4-alpha4 interface is required for Zn²⁺ potentiation. *J Neurosci*, **28**, 6884-94.

- MORONI, M., ZWART, R., SHER, E., CASSELS, B.K. y BERMUDEZ, I. (2006). $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol Pharmacol*, **70**, 755-68.
- MUKHTASIMOVA, N., FREE, C. y SINE, S.M. (2005). Initial coupling of binding to gating mediated by conserved residues in the muscle nicotinic receptor. *J Gen Physiol*, **126**, 23-39.
- MURRAY, T.A., BERTRAND, D., PAPKE, R.L., GEORGE, A.A., PANTOJA, R., SRINIVASAN, R., LIU, Q., WU, J., WHITEAKER, P., LESTER, H.A. y LUKAS, R.J. $\alpha 7\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors assemble, function, and are activated primarily via their $\alpha 7\alpha 7$ interfaces. *Mol Pharmacol*, **81**, 175-88.
- NELSON, M.E., KURYATOV, A., CHOI, C.H., ZHOU, Y. y LINDSTROM, J. (2003). Alternate stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, **63**, 332-41.
- NELSON, M.E. y LINDSTROM, J. (1999). Single channel properties of human $\alpha 3$ AChRs: impact of $\beta 2$, $\beta 4$ and $\alpha 5$ subunits. *J Physiol*, **516** (Pt 3), 657-78.
- NG, H.J., WHITEMORE, E.R., TRAN, M.B., HOGENKAMP, D.J., BROIDE, R.S., JOHNSTONE, T.B., ZHENG, L., STEVENS, K.E. y GEE, K.W. (2007). Nootropic $\alpha 7$ nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 8059-64.
- NGUYEN, Q.T. y MILEDI, R. (2002). Inhibition of skeletal muscle nicotinic receptors by the atypical antipsychotic clozapine. *Neuropharmacology*, **42**, 662-9.
- NGUYEN, V.T., NDOYE, A. y GRANDO, S.A. (2000). Novel human $\alpha 9$ acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol*, **157**, 1377-91.
- NICKE, A., RETTINGER, J. y SCHMALZING, G. (2003). Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers. *Mol Pharmacol*, **63**, 243-52.
- NORTH, R.A. (1996). P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found Symp*, **198**, 91-105; discussion 105-9.
- NORTH, R.A., SLACK, B.E. y SURPRENANT, A. (1985). Muscarinic M1 and M2 receptors mediate depolarization and presynaptic inhibition in guinea-pig enteric nervous system. *J Physiol*, **368**, 435-52.
- NORTH, R.A. y TOKIMASA, T. (1983). Depression of calcium-dependent potassium conductance of guinea-pig myenteric neurones by muscarinic agonists. *J Physiol*, **342**, 253-66.
- OCHOA, E.L., CHATTOPADHYAY, A. y MCNAMEE, M.G. (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol*, **9**, 141-78.
- OHNO, K., WANG, H.L., MILONE, M., BREN, N., BRENGMAN, J.M., NAKANO, S., QUIRAM, P., PRUITT, J.N., SINE, S.M. y ENGEL, A.G. (1996). Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron*, **17**, 157-70.
- OKA, K., ANDOH, T., WATANABE, I., KAMIYA, Y. y ITO, H. (1998). Inhibition of the neuronal nicotinic receptor-mediated current by kappa opioid receptor agonists in PC12 cells. *Pflugers Arch*, **436**, 887-93.

- ORTELLS, M.O. y LUNT, G.G. (1995). Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci*, **18**, 121-7.
- PAAS, Y., GIBOR, G., GRAILHE, R., SAVATIER-DUCLERT, N., DUFRESNE, V., SUNESEN, M., DE CARVALHO, L.P., CHANGEUX, J.P. y ATTALI, B. (2005). Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15877-82.
- PALMA, E., BERTRAND, S., BINZONI, T. y BERTRAND, D. (1996). Neuronal nicotinic alpha 7 receptor expressed in *Xenopus* oocytes presents five putative binding sites for methyllycaconitine. *J Physiol*, **491** (Pt 1), 151-61.
- PALMA, E., MAGGI, L., MILEDI, R. y EUSEBI, F. (1998). Effects of Zn²⁺ on wild and mutant neuronal alpha7 nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10246-50.
- PAPKE, R.L., BOULTER, J., PATRICK, J. y HEINEMANN, S. (1989). Single-channel currents of rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron*, **3**, 589-96.
- PAPKE, R.L. y HEINEMANN, S.F. (1991). The role of the beta 4-subunit in determining the kinetic properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine alpha 3-receptors. *J Physiol*, **440**, 95-112.
- PAPKE, R.L. y HEINEMANN, S.F. (1994). Partial agonist properties of cytisine on neuronal nicotinic receptors containing the beta 2 subunit. *Mol Pharmacol*, **45**, 142-9.
- PAPKE, R.L., PORTER PAPKE, J.K. y ROSE, G.M. (2004). Activity of alpha7-selective agonists at nicotinic and serotonin 5HT₃ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Bioorg Med Chem Lett*, **14**, 1849-53.
- PARADISO, K.G. y STEINBACH, J.H. (2003). Nicotine is highly effective at producing desensitization of rat alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors. *J Physiol*, **553**, 857-71.
- PATERSON, D. y NORDBERG, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol*, **61**, 75-111.
- PATON, W.D. y ZAIMIS, E.J. (1949). The pharmacological actions of polymethylene bistrimethyl-ammonium salts. *Br J Pharmacol Chemother*, **4**, 381-400.
- PEREZ, L., KERRIGAN, J.E., LI, X. y FAN, H. (2007). Substitution of methionine 435 with leucine, isoleucine, and serine in tumor necrosis factor alpha converting enzyme inactivates ectodomain shedding activity. *Biochem Cell Biol*, **85**, 141-9.
- PETERS, J.A., HALES, T.G. y LAMBERT, J.J. (2005). Molecular determinants of single-channel conductance and ion selectivity in the Cys-loop family: insights from the 5-HT₃ receptor. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 587-94.
- PETTIT, D.L., SHAO, Z. y YAKEL, J.L. (2001). beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci*, **21**, RC120.
- PICCIOTTO, M.R., BRUNZELL, D.H. y CALDARONE, B.J. (2002). Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, **13**, 1097-106.
- PICCIOTTO, M.R., ZOLI, M., RIMONDINI, R., LENA, C., MARUBIO, L.M., PICH, E.M., FUXE, K. y CHANGEUX, J.P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*, **391**, 173-7.
- POMERLEAU, O.F., DOWNEY, K.K., STELSON, F.W. y POMERLEAU, C.S. (1995). Cigarette smoking in adult patients diagnosed with attention deficit hyperactivity disorder. *J Subst Abuse*, **7**, 373-8.

- PREMKUMAR, L.S. y AUERBACH, A. (1997). Stoichiometry of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels inferred from single-channel current patterns. *J Gen Physiol*, **110**, 485-502.
- QUICK, M.W. y LESTER, R.A. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol*, **53**, 457-78.
- QUICK, M. y KULAK, J.M. (2002). Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, **23**, 581-94.
- QUICK, M., POLONSKAYA, Y., GILLESPIE, A., JAKOWEC, M., LLOYD, G.K. y LANGSTON, J.W. (2000). Localization of nicotinic receptor subunit mRNAs in monkey brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, **425**, 58-69.
- RACHLINE, J., PERIN-DUREAU, F., LE GOFF, A., NEYTON, J. y PAOLETTI, P. (2005). The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci*, **25**, 308-17.
- RAIMONDI, E., RUBBOLI, F., MORALLI, D., CHINI, B., FORNASARI, D., TARRONI, P., DE CARLI, L. y CLEMENTI, F. (1992). Chromosomal localization and physical linkage of the genes encoding the human alpha 3, alpha 5, and beta 4 neuronal nicotinic receptor subunits. *Genomics*, **12**, 849-50.
- RAMIREZ-LATORRE, J., YU, C.R., QU, X., PERIN, F., KARLIN, A. y ROLE, L. (1996). Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature*, **380**, 347-51.
- RAYES, D., DE ROSA, M.J., SINE, S.M. y BOUZAT, C. (2009). Number and locations of agonist binding sites required to activate homomeric Cys-loop receptors. *J Neurosci*, **29**, 6022-32.
- REEVES, D.C., GOREN, E.N., AKABAS, M.H. y LUMMIS, S.C. (2001). Structural and electrostatic properties of the 5-HT3 receptor pore revealed by substituted cysteine accessibility mutagenesis. *J Biol Chem*, **276**, 42035-42.
- REITSTETTER, R., HE, D.S. y GRUENER, R. (1994). Oxotremorine-M activates single nicotinic acetylcholine receptor channels in cultured *Xenopus* myocytes. *Eur J Pharmacol*, **264**, 27-32.
- REVAH, F., BERTRAND, D., GALZI, J.L., DEVILLERS-THIERY, A., MULLE, C., HUSSY, N., BERTRAND, S., BALLIVET, M. y CHANGEUX, J.P. (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*, **353**, 846-9.
- RINGDAHL, B. y JENDEN, D.J. (1983). Pharmacological properties of oxotremorine and its analogs. *Life Sci*, **32**, 2401-13.
- ROGERS, S.W., MANDELZYS, A., DENERIS, E.S., COOPER, E. y HEINEMANN, S. (1992). The expression of nicotinic acetylcholine receptors by PC12 cells treated with NGF. *J Neurosci*, **12**, 4611-23.
- ROLE, L.W. (1984). Substance P modulation of acetylcholine-induced currents in embryonic chicken sympathetic and ciliary ganglion neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 2924-8.
- ROMANO, C. y GOLDSTEIN, A. (1980). Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes. *Science*, **210**, 647-50.
- ROSENMUND, C., STERN-BACH, Y. y STEVENS, C.F. (1998). The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*, **280**, 1596-9.

- ROSSI, F.M., PIZZORUSSO, T., PORCIATTI, V., MARUBIO, L.M., MAFFEI, L. y CHANGEUX, J.P. (2001). Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 6453-8.
- RUST, G., BURGUNDER, J.M., LAUTERBURG, T.E. y CACHELIN, A.B. (1994). Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in the rat autonomic nervous system. *Eur J Neurosci*, **6**, 478-85.
- SALMINEN, O., DRAPEAU, J.A., MCINTOSH, J.M., COLLINS, A.C., MARKS, M.J. y GRADY, S.R. (2007). Pharmacology of alpha-conotoxin MII-sensitive subtypes of nicotinic acetylcholine receptors isolated by breeding of null mutant mice. *Mol Pharmacol*, **71**, 1563-71.
- SAMOCHOCKI, M., HOFFLE, A., FEHRENBACHER, A., JOSTOCK, R., LUDWIG, J., CHRISTNER, C., RADINA, M., ZERLIN, M., ULLMER, C., PEREIRA, E.F., LUBBERT, H., ALBUQUERQUE, E.X. y MAELICKE, A. (2003). Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**, 1024-36.
- SARGENT, P.B. (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci*, **16**, 403-43.
- SCHOEPFER, R., CONROY, W.G., WHITING, P., GORE, M. y LINDSTROM, J. (1990). Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily. *Neuron*, **5**, 35-48.
- SCHULLER, H.M., JULL, B.A., SHEPPARD, B.J. y PLUMMER, H.K. (2000). Interaction of tobacco-specific toxicants with the neuronal alpha(7) nicotinic acetylcholine receptor and its associated mitogenic signal transduction pathway: potential role in lung carcinogenesis and pediatric lung disorders. *Eur J Pharmacol*, **393**, 265-77.
- SEERDEN, J.P., TULP, M.T., SCHEEREN, H.W. y KRUSE, C.G. (1998). Synthesis and structure-activity data of some new epibatidine analogues. *Bioorg Med Chem*, **6**, 2103-10.
- SEGUELA, P., WADICHE, J., DINELEY-MILLER, K., DANI, J.A. y PATRICK, J.W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, **13**, 596-604.
- SGARD, F., CHARPANTIER, E., BERTRAND, S., WALKER, N., CAPUT, D., GRAHAM, D., BERTRAND, D. y BESNARD, F. (2002). A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol*, **61**, 150-9.
- SHARMA, G. y VIJAYARAGHAVAN, S. (2002). Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *J Neurobiol*, **53**, 524-34.
- SHER, E., CHEN, Y., SHARPLES, T.J., BROAD, L.M., BENEDETTI, G., ZWART, R., MCPHIE, G.I., PEARSON, K.H., BALDWINSON, T. y DE FILIPPI, G. (2004). Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem*, **4**, 283-97.
- SHIMOHAMA, S., AKAIKE, A. y KIMURA, J. (1996). Nicotine-induced protection against glutamate cytotoxicity. Nicotinic cholinergic receptor-mediated inhibition of nitric oxide formation. *Ann N Y Acad Sci*, **777**, 356-61.
- SHIRAISHI, M., MINAMI, K., UEZONO, Y., YANAGIHARA, N., SHIGEMATSU, A. y SHIBUYA, I. (2002). Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in

- adrenal chromaffin cells and in *Xenopus* oocytes expressing alpha 7 receptors. *Br J Pharmacol*, **136**, 207-16.
- SHIRVAN, M.H., POLLARD, H.B. y HELDMAN, E. (1991). Mixed nicotinic and muscarinic features of cholinergic receptor coupled to secretion in bovine chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4860-4.
- SHYTLER, R.D., SILVER, A.A., LUKAS, R.J., NEWMAN, M.B., SHEEHAN, D.V. y SANBERG, P.R. (2002a). Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Mol Psychiatry*, **7**, 525-35.
- SHYTLER, R.D., SILVER, A.A., SHEEHAN, K.H., SHEEHAN, D.V. y SANBERG, P.R. (2002b). Neuronal nicotinic receptor inhibition for treating mood disorders: preliminary controlled evidence with mecamylamine. *Depress Anxiety*, **16**, 89-92.
- SINE, S.M. y CLAUDIO, T. (1991). Stable expression of the mouse nicotinic acetylcholine receptor in mouse fibroblasts. Comparison of receptors in native and transfected cells. *J Biol Chem*, **266**, 13679-89.
- SINE, S.M. y ENGEL, A.G. (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, **440**, 448-55.
- SINE, S.M., KREIENKAMP, H.J., BREN, N., MAEDA, R. y TAYLOR, P. (1995). Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity. *Neuron*, **15**, 205-11.
- SINGHAL, S.K., ZHANG, L., MORALES, M. y OZ, M. (2007). Antipsychotic clozapine inhibits the function of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, **52**, 387-94.
- SIVILLOTTI, L.G., MCNEIL, D.K., LEWIS, T.M., NASSAR, M.A., SCHOEPFER, R. y COLQUHOUN, D. (1997). Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *J Physiol*, **500** (Pt 1), 123-38.
- SLATER, Y.E., HOULIHAN, L.M., MASKELL, P.D., EXLEY, R., BERMUDEZ, I., LUKAS, R.J., VALDIVIA, A.C. y CASSELS, B.K. (2003). Halogenated cytosine derivatives as agonists at human neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Neuropharmacology*, **44**, 503-15.
- SMIT, A.B., SYED, N.I., SCHAAP, D., VAN MINNEN, J., KLUMPERMAN, J., KITS, K.S., LODDER, H., VAN DER SCHORS, R.C., VAN ELK, R., SORGEDRAGER, B., BREJC, K., SIXMA, T.K. y GERAERTS, W.P. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*, **411**, 261-8.
- SMULDERS, C.J., ZWART, R., BERMUDEZ, I., VAN KLEEF, R.G., GROOT-KORMELINK, P.J. y VIJVERBERG, H.P. (2005). Cholinergic drugs potentiate human nicotinic alpha4beta2 acetylcholine receptors by a competitive mechanism. *Eur J Pharmacol*, **509**, 97-108.
- SOLIAKOV, L., GALLAGHER, T. y WONNACOTT, S. (1995). Anatoxin-a-evoked [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology*, **34**, 1535-41.
- SOLT, K., RUESCH, D., FORMAN, S.A., DAVIES, P.A. y RAINES, D.E. (2007). Differential effects of serotonin and dopamine on human 5-HT_{3A} receptor kinetics: interpretation within an allosteric kinetic model. *J Neurosci*, **27**, 13151-60.
- SPANDE, T.F., GARRAFFO, H.M., YEH, H.J., PU, Q.L., PANNELL, L.K. y DALY, J.W. (1992). A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F. *J Nat Prod*, **55**, 707-22.

- STEPHENSON, R.P. (1956). A modification of receptor theory. *Br J Pharmacol Chemother*, **11**, 379-93.
- STOKES, C. y PAPKE, R.L. Use of an $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor subunit concatamer to characterize ganglionic receptor subtypes with specific subunit composition reveals species-specific pharmacologic properties. *Neuropharmacology*, **63**, 538-46.
- STOOP, R., THOMAS, S., RASSENDREN, F., KAWASHIMA, E., BUELL, G., SURPRENANT, A. y NORTH, R.A. (1999). Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol*, **56**, 973-81.
- STROUD, R.M., MCCARTHY, M.P. y SHUSTER, M. (1990). Nicotinic acetylcholine receptor superfamily of ligand-gated ion channels. *Biochemistry*, **29**, 11009-23.
- SWANSON, K.L. y ALBUQUERQUE, E.X. (1992). Progress in understanding the nicotinic acetylcholine receptor function at central and peripheral nervous system synapses through toxin interactions. *Md Med J*, **41**, 623-31.
- SWANSON, K.L., ALLEN, C.N., ARONSTAM, R.S., RAPOPORT, H. y ALBUQUERQUE, E.X. (1986). Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol Pharmacol*, **29**, 250-7.
- TAPPER, A.R., MCKINNEY, S.L., NASHMI, R., SCHWARZ, J., DESHPANDE, P., LABARCA, C., WHITEAKER, P., MARKS, M.J., COLLINS, A.C. y LESTER, H.A. (2004). Nicotine activation of $\alpha 4^*$ receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science*, **306**, 1029-32.
- THANVI, B.R. y LO, T.C. (2004). Update on myasthenia gravis. *Postgrad Med J*, **80**, 690-700.
- THOMAS, P., STEPHENS, M., WILKIE, G., AMAR, M., LUNT, G.G., WHITING, P., GALLAGHER, T., PEREIRA, E., ALKONDON, M., ALBUQUERQUE, E.X. y ET AL. (1993). (+)-Anatoxin-a is a potent agonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem*, **60**, 2308-11.
- TIERNEY, M.L. y UNWIN, N. (2000). Electron microscopic evidence for the assembly of soluble pentameric extracellular domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Mol Biol*, **303**, 185-96.
- TIMMERMANN, D.B., GRONLIEN, J.H., KOHLHAAS, K.L., NIELSEN, E.O., DAM, E., JORGENSEN, T.D., AHRING, P.K., PETERS, D., HOLST, D., CHRISTENSEN, J.K., MALYSZ, J., BRIGGS, C.A., GOPALAKRISHNAN, M. y OLSEN, G.M. (2007). An allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, **323**, 294-307.
- TRIFARO, J.M. y LEE, R.W. (1980). Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience*, **5**, 1533-46.
- ULENS, C., HOGG, R.C., CELIE, P.H., BERTRAND, D., TSETLIN, V., SMIT, A.B. y SIXMA, T.K. (2006). Structural determinants of selective α -conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3615-20.
- UNWIN, N. (1989). The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron*, **3**, 665-76.
- UNWIN, N. (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol*, **229**, 1101-24.

- UNWIN, N. (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*, **373**, 37-43.
- UNWIN, N. (1996). Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. *J Mol Biol*, **257**, 586-96.
- UNWIN, N. (2003). Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett*, **555**, 91-5.
- UNWIN, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol*, **346**, 967-89.
- UNWIN, N., MIYAZAWA, A., LI, J. y FUJIYOSHI, Y. (2002). Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J Mol Biol*, **319**, 1165-76.
- VAILATI, S., HANKE, W., BEJAN, A., BARABINO, B., LONGHI, R., BALESTRA, B., MORETTI, M., CLEMENTI, F. y GOTTI, C. (1999). Functional alpha6-containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol*, **56**, 11-9.
- VAILATI, S., MORETTI, M., BALESTRA, B., MCINTOSH, M., CLEMENTI, F. y GOTTI, C. (2000). beta3 subunit is present in different nicotinic receptor subtypes in chick retina. *Eur J Pharmacol*, **393**, 23-30.
- VERBITSKY, M., ROTHLIN, C.V., KATZ, E. y ELGOYHEN, A.B. (2000). Mixed nicotinic-muscarinic properties of the alpha9 nicotinic cholinergic receptor. *Neuropharmacology*, **39**, 2515-24.
- VERNINO, S., HOPKINS, S. y WANG, Z. (2009). Autonomic ganglia, acetylcholine receptor antibodies, and autoimmune ganglionopathy. *Auton Neurosci*, **146**, 3-7.
- VERNINO, S., LOW, P.A., FEALEY, R.D., STEWART, J.D., FARRUGIA, G. y LENNON, V.A. (2000). Autoantibodies to ganglionic acetylcholine receptors in autoimmune autonomic neuropathies. *N Engl J Med*, **343**, 847-55.
- VETTER, D.E., KATZ, E., MAISON, S.F., TARANDA, J., TURCAN, S., BALLESTERO, J., LIBERMAN, M.C., ELGOYHEN, A.B. y BOULTER, J. (2007). The alpha10 nicotinic acetylcholine receptor subunit is required for normal synaptic function and integrity of the olivocochlear system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 20594-9.
- VIJAYARAGHAVAN, S., SCHMID, H.A. y MAPP, K.S. (1993). Serotonin modulates nicotinic responses of adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*, **61**, 324-31.
- VILLARROEL, A., HERLITZE, S., KOENEN, M. y SAKMANN, B. (1991). Location of a threonine residue in the alpha-subunit M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel. *Proc Biol Sci*, **243**, 69-74.
- VILLARROEL, A. y SAKMANN, B. (1992). Threonine in the selectivity filter of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J*, **62**, 196-205; discussion 205-8.
- VINCLER, M. (2005). Neuronal nicotinic receptors as targets for novel analgesics. *Expert Opin Investig Drugs*, **14**, 1191-8.
- VINCLER, M., WITTENAUER, S., PARKER, R., ELLISON, M., OLIVERA, B.M. y MCINTOSH, J.M. (2006). Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 17880-4.
- VIZI, E.S. y LENDVAI, B. (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, **30**, 219-35.

- WADA, E., WADA, K., BOULTER, J., DENERIS, E., HEINEMANN, S., PATRICK, J. y SWANSON, L.W. (1989). Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, **284**, 314-35.
- WANG, F., GERZANICH, V., WELLS, G.B., ANAND, R., PENG, X., KEYSER, K. y LINDSTROM, J. (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem*, **271**, 17656-65.
- WANG, H., YU, M., OCHANI, M., AMELLA, C.A., TANOVIC, M., SUSARLA, S., LI, J.H., WANG, H., YANG, H., ULLOA, L., AL-ABED, Y., CZURA, C.J. y TRACEY, K.J. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, **421**, 384-8.
- WARD, J.M., COCKCROFT, V.B., LUNT, G.G., SMILLIE, F.S. y WONNACOTT, S. (1990). Methylllycaconitine: a selective probe for neuronal alpha-bungarotoxin binding sites. *FEBS Lett*, **270**, 45-8.
- WENGER, B.W., BRYANT, D.L., BOYD, R.T. y MCKAY, D.B. (1997). Evidence for spare nicotinic acetylcholine receptors and a beta 4 subunit in bovine adrenal chromaffin cells: studies using bromoacetylcholine, epibatidine, cytisine and mAb35. *J Pharmacol Exp Ther*, **281**, 905-13.
- WESSLER, I. y KIRKPATRICK, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*, **154**, 1558-71.
- WEST, K.A., BROGNARD, J., CLARK, A.S., LINNOILA, I.R., YANG, X., SWAIN, S.M., HARRIS, C., BELINSKY, S. y DENNIS, P.A. (2003). Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, **111**, 81-90.
- WHITEAKER, P., PETERSON, C.G., XU, W., MCINTOSH, J.M., PAYLOR, R., BEAUDET, A.L., COLLINS, A.C. y MARKS, M.J. (2002). Involvement of the alpha3 subunit in central nicotinic binding populations. *J Neurosci*, **22**, 2522-9.
- WHITING, P., SCHOEPFER, R., LINDSTROM, J. y PRIESTLEY, T. (1991). Structural and pharmacological characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol Pharmacol*, **40**, 463-72.
- WILSON, S.P. y KIRSHNER, N. (1977). The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J Neurochem*, **28**, 687-95.
- WONNACOTT, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci*, **20**, 92-8.
- WU, J., KUO, Y.P., GEORGE, A.A., XU, L., HU, J. y LUKAS, R.J. (2004). beta-Amyloid directly inhibits human alpha4beta2-nicotinic acetylcholine receptors heterologously expressed in human SH-EP1 cells. *J Biol Chem*, **279**, 37842-51.
- WU, T.Y., SMITH, C.M., SINE, S.M. y LEVANDOSKI, M.M. (2008). Morantel allosterically enhances channel gating of neuronal nicotinic acetylcholine alpha 3 beta 2 receptors. *Mol Pharmacol*, **74**, 466-75.
- XIAO, Y., SMITH, R.D., CARUSO, F.S. y KELLAR, K.J. (2001). Blockade of rat alpha3beta4 nicotinic receptor function by methadone, its metabolites, and structural analogs. *J Pharmacol Exp Ther*, **299**, 366-71.
- XU, M. y AKABAS, M.H. (1993). Amino acids lining the channel of the gamma-aminobutyric acid type A receptor identified by cysteine substitution. *J Biol Chem*, **268**, 21505-8.

- XU, M. y AKABAS, M.H. (1996). Identification of channel-lining residues in the M2 membrane-spanning segment of the GABA(A) receptor alpha1 subunit. *J Gen Physiol*, **107**, 195-205.
- XU, W., GELBER, S., ORR-URTREGER, A., ARMSTRONG, D., LEWIS, R.A., OU, C.N., PATRICK, J., ROLE, L., DE BIASI, M. y BEAUDET, A.L. (1999a). Megacystis, mydriasis, and ion channel defect in mice lacking the alpha3 neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5746-51.
- XU, W., ORR-URTREGER, A., NIGRO, F., GELBER, S., SUTCLIFFE, C.B., ARMSTRONG, D., PATRICK, J.W., ROLE, L.W., BEAUDET, A.L. y DE BIASI, M. (1999b). Multiorgan autonomic dysfunction in mice lacking the beta2 and the beta4 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*, **19**, 9298-305.
- YU, C.R. y ROLE, L.W. (1998a). Functional contribution of the alpha5 subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones. *J Physiol*, **509** (Pt 3), 667-81.
- YU, C.R. y ROLE, L.W. (1998b). Functional contribution of the alpha7 subunit to multiple subtypes of nicotinic receptors in embryonic chick sympathetic neurones. *J Physiol*, **509** (Pt 3), 651-65.
- YU, D., ZHANG, L., EISELE, J.L., BERTRAND, D., CHANGEUX, J.P. y WEIGHT, F.F. (1996). Ethanol inhibition of nicotinic acetylcholine type alpha 7 receptors involves the amino-terminal domain of the receptor. *Mol Pharmacol*, **50**, 1010-6.
- ZBARSKY, V., THOMAS, J. y GREENFIELD, S. (2004). Bioactivity of a peptide derived from acetylcholinesterase: involvement of an ivermectin-sensitive site on the alpha 7 nicotinic receptor. *Neurobiol Dis*, **16**, 283-9.
- ZHANG, Z.W., COGGAN, J.S. y BERG, D.K. (1996). Synaptic currents generated by neuronal acetylcholine receptors sensitive to alpha-bungarotoxin. *Neuron*, **17**, 1231-40.
- ZHOU, X.F. y LIVETT, B.G. (1990). Substance P increases catecholamine secretion from perfused rat adrenal glands evoked by prolonged field stimulation. *J Physiol*, **425**, 321-34.
- ZHOU, Y., NELSON, M.E., KURYATOV, A., CHOI, C., COOPER, J. y LINDSTROM, J. (2003). Human alpha4beta2 acetylcholine receptors formed from linked subunits. *J Neurosci*, **23**, 9004-15.
- ZOLI, M., MORETTI, M., ZANARDI, A., MCINTOSH, J.M., CLEMENTI, F. y GOTTI, C. (2002). Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci*, **22**, 8785-9.
- ZUO, J., TREADAWAY, J., BUCKNER, T.W. y FRITZSCH, B. (1999). Visualization of alpha9 acetylcholine receptor expression in hair cells of transgenic mice containing a modified bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14100-5.
- ZWART, R., DE FILIPPI, G., BROAD, L.M., MCPHIE, G.I., PEARSON, K.H., BALDWINSON, T. y SHER, E. (2002). 5-Hydroxyindole potentiates human alpha 7 nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices. *Neuropharmacology*, **43**, 374-84.
- ZWART, R. y VIJVERBERG, H.P. (1998). Four pharmacologically distinct subtypes of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol*, **54**, 1124-31.

